

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

## BACTERIOPHAGIE ET VARIABILITE MICROBIENNE

par les D<sup>rs</sup> JULES BORDET et PAUL BORDET (\*).

(Suite)

### CHAPITRE II

Influence de la température sur les caractères des cultures  
et la production du principe lytique.

#### A. — BACILLE COLIFORME DE LISBONNE.

Repiquons en strie sur quelques tubes de gélose ordinaire le bacille de Lisbonne qui, comme nous l'avons signalé, se développe à 37° sous forme d'un gazon microbien offrant un miroitement métallique. Mais, aussitôt après l'ensemencement, plaçons quelques-uns de ces tubes, non pas à l'étuve, mais dans un local (on opère en hiver) dont la température reste voisine de 10 à 12°. A cette température le développement s'effectue encore, mais exige quelques jours pour constituer une trainée assez épaisse, qui bientôt devient saillante et glaireuse et ne présente pas le reflet métallique si caractéristique des cultures développées à 37°. Pratiqué à ce moment, l'examen microscopique montre que les bacilles sont assez courts, gros et trapus, et entourés d'une capsule épaisse (4). Les microbes sont plongés dans une matière

(\*) Voir ces *Annales*, 1946, 72, 161.

(4) Ces capsules ne se produisent pas si l'on emploie pour ces expériences une culture qui a subi 5 ou 6 passages dans le bouillon ordi-



muqueuse qui, colorée par le bleu de toluidine, prend une teinte rougeâtre. Si l'on colore par la fuchsine, la lame réfléchit la lumière en un miroitement doré. Sans attendre que le milieu nutritif soit trop épuisé, portons maintenant à l'étuve cette culture sur gélose. Dès le lendemain, on constate un changement d'aspect qui s'accuse encore le jour suivant. La traînée s'affaisse en se recouvrant de la pellicule luisante. L'examen au microscope révèle que les microbes courts et trapus qui s'étaient développés à froid ont perdu presque complètement leur colorabilité comme s'ils subissaient une lyse prononcée ; les capsules qui les entouraient disparaissent complètement. Mais une nouvelle génération microbienne a apparu, très différente de la précédente. Ces nouveaux microbes sont beaucoup plus longs, ce sont des filaments souvent sinueux qui se colorent très fortement. Ajoutons que ce phénomène de remplacement des microbes développés à basse température par des microbes morphologiquement différents, phénomène qui se produit lorsque la culture est transportée à 37°, s'observe également lorsque la gélose utilisée a été additionnée d'oxalate de soude. Nous allons signaler des faits très analogues à propos du bacille pyocyanique, avec cette différence toutefois que dans le cas de ce microbe le calcium semble nécessaire à la lyse que les microbes développés à froid subissent lorsque la température s'élève. Reconnaissons au surplus que cette différence de comportement par rapport au calcium est difficile à expliquer.

Reprenons maintenant les cultures en question du bacille de Lisbonne, les unes qui ont été constamment maintenues à basse température, les autres qui après s'être développées tout d'abord à froid ont été mises pendant vingt-quatre heures à l'étuve. Nous disposons aussi d'autres cultures, qui, placées à 37° immédiatement après l'ensemencement, se sont développées pendant un jour à cette température. Délayons de telles cultures dans du bouillon stérile, en ayant soin de

naire, lequel contient un peu de calcium. Dans une telle culture, en effet, qui présente nettement le phénomène d'auto-agglutination, une transformation étendue de la race S en variété R s'est effectuée. La propriété d'élaborer des capsules à basse température appartient à la race S. Cultivée à froid, la race R affecte aussi la forme de bacilles courts et trapus, mais dont les bouts sont généralement carrés au lieu d'être arrondis ; le manque de capsules permet de les reconnaître aisément. Reportée à 37°, cette culture de R, développée d'abord à froid, subit également une lyse manifeste en donnant lieu à l'apparition des microbes fort allongés, très colorables, que nous signalons plus loin.

La production de capsules dans les cultures développées à basse température est particulièrement frappante lorsqu'on emploie des cultures qui ont subi quelques passages en bouillon oxalaté. Nous avons signalé plus haut que la privation de calcium entrave l'apparition de la race R.



faire en sorte que la suspension de la culture constamment maintenue à basse température soit visiblement plus opaque que les suspensions des cultures qui ont été exposées à la température de 37° soit d'emblée, soit après un séjour à froid. Dès que ces suspensions sont préparées, chauffons-les à 60° pendant une demi-heure, et recherchons si elles contiennent un principe actif sur le bacille de Shiga. Dans des tubes contenant 5 c. c. de bouillon, introduisons I goutte de solution à 1 p. 100 de  $\text{CaCl}_2$  (5), I goutte de culture de bacille de Shiga et III gouttes de l'une ou l'autre des suspensions chauffées.

Le résultat de cette épreuve est net : les microbes qui ont poussé à froid n'ont pas produit de principe. Mais il suffit d'exposer pendant vingt-quatre heures à 37° une culture d'abord développée vers 10-12° pour que le principe y apparaisse ; bien entendu le même principe existe aussi dans les cultures développées directement à 37° (6). Ce résultat concorde entièrement avec celui que Gildemeister a obtenu en opérant sur le bacille lysogène dont il disposait.

Même si le bacille de Lisbonne a été entretenu assez longtemps à la température toujours basse de 10-12° en subissant des repiquages successifs, il reprend son activité lysogène dès qu'on le replace ensuite à la température de l'étuve.

C'est évidemment une donnée frappante qu'une coïncidence manifeste existe entre l'apparition du principe et le fait qu'une lyse intense s'effectue lorsque la culture développée d'abord à froid est transportée ensuite à 37°, et il semble assez rationnel de supposer que ce principe intervient dans la lyse. Reconnaissons toutefois qu'une difficulté s'oppose à cette conception, consistant en ce que, dans les expériences que nous venons de relater, la lyse consécutive à l'élévation de la température se produit même si le milieu nutritif a été oxalaté, tandis que l'oxalate empêche la lyse du bacille de Shiga par ce principe. Si l'on étale une goutte de culture de bacille de Shiga sur une gélose oxalatée, et si l'on dépose ensuite, sur cette surface ensemencée, une trace de principe, la culture se développe à 37° sans présenter aucune plage lytique, tandis qu'une zone de clarification lytique apparaît dans les mêmes conditions si l'on emploie une gélose qui n'a pas été oxalatée. Ajoutons encore que, comme on le démontre aisément, le froid qui empêche la production du principe s'oppose également à la lyse du bacille de Shiga par ce même principe.

(5) Rappelons qu'un peu de sel de calcium est nécessaire à la lyse du bacille de Shiga par le principe en question.

(6) Cette expérience donne, comme il faut s'y attendre, les mêmes résultats si elle porte sur la variété R isolée, puisque c'est la variété R qui est productrice de principe : développées à basse température, les cultures du type R ne manifestent pas d'activité lysogène.



Le fait que le froid empêche la lyse a déjà été démontré pour certains principes [13].

P. Bordet et J. Beumer [14] ont montré, à ce propos, l'existence d'un rapport entre l'influence du froid sur la sensibilité à la lyse et son action sur la constitution antigénique du microbe. Leur étude a porté sur un colibacille sensible à deux bactériophages distincts longuement étudiés par l'un de nous dans des travaux antérieurs et dénommés respectivement principe faible et principe fort pour la raison que le premier ne lyse que la variété S du colibacille en question, tandis que le second est actif à la fois sur S et R. Lorsqu'on la cultive en-dessous de 20°, la variété S prend les caractères culturels et antigéniques de R. Or, dans ces conditions, elle perd sa sensibilité au principe faible, qui ne se régénère plus à son contact, tandis qu'elle conserve intacte, de même que R, sa réceptivité au principe fort, lequel se reproduit normalement. En outre, et corrélativement, S, cultivé en-dessous de 20°, n'élabore plus la substance inhibitrice spécifiquement appropriée au principe faible, tout en continuant, de même que R, de former celle qui agit sur le principe fort. Il est intéressant de noter, en rapprochant ces résultats des nôtres, que la culture à température basse, susceptible de modifier la constitution antigénique, peut, corrélativement, influencer à la fois le pouvoir lysogène et la sensibilité à la lyse.

#### B. — BACILLE PYOCYANIQUE.

Ensemencée en strie sur gélose, la race lysable du pyocyanique ne montre ni lyse, ni production de pigment lorsque la gélose est exposée, aussitôt après l'ensemencement, à une basse température (10-12°). Dans ces conditions, le développement est naturellement assez lent; après quelques jours, il donne lieu à une trainée grasse, assez saillante et blanchâtre, sur laquelle on n'aperçoit aucune cupule de lyse, ni aucun dépôt de la matière à reflet métallique. Cette trainée peut, au bout d'un certain temps, s'entourer d'un liséré, mais celui-ci reste également incolore et ne se lyse pas. Or, l'aspect de cette culture se modifie de la manière la plus frappante lorsqu'on la transporte à 37°. Au bout d'un ou deux jours à l'étuve, la trainée auparavant saillante, blanchâtre et opaque, s'affaisse manifestement et se recouvre des taches de lyse à reflet métallique; la pellicule d'aspect métallique recouvre aussi le liséré qui s'amincit tout en s'élargissant beaucoup, tandis que le pigment vert bleuâtre apparaît.

L'examen microscopique de la culture avant et après le transfert à 37° donne des résultats analogues à ceux que nous avons signalés ci-dessus à propos du bacille de Lisbonne. Maintenu à froid, la culture ne subit pas de lyse. Le lendemain du trans-



fert à 37°, on constate que les microbes développés à froid ont subi une lyse généralisée, ils ont perdu leur colorabilité, tandis qu'une nouvelle génération microbienne a apparu, composée d'individus très fortement colorables, en général plus minces, remplaçant ainsi la génération précédente qui tend à disparaître. Celle-ci était composée d'individus plus trapus que l'on reconnaît facilement.

Il est intéressant de répéter cette expérience en employant non seulement de la gélose ordinaire contenant du calcium, mais aussi, et comparativement, de la gélose oxalatée. Cultivés à froid, les microbes sont un peu plus petits en gélose calcifiée qu'en gélose oxalatée. Mais l'effet du transfert à 37° des cultures développées à froid est très différent selon que la gélose est normale ou a été oxalatée. Sur gélose oxalatée, la trainée blanchâtre qui s'était produite à froid ne se modifie guère. Le reflet métallique n'y apparaît pas ou ne se montre que très discrètement. Tandis que sur gélose ordinaire, après transfert à 37°, la trainée microbienne qui était grasse et opaque s'aplatit, semble se liquéfier et devient transparente, la culture sur gélose oxalatée, dans les mêmes conditions, ne montre rien de pareil. Elle garde son aspect primitif, aucune tache de lyse n'y apparaît. Au microscope, on ne constate aucune destruction des microbes qui s'étaient développés à froid.

La lyse est donc fonction à la fois de la température et du calcium. Longtemps entretenue à basse température par des passages successifs, la culture, qui pendant cette période n'a montré aucune lyse, redevient immédiatement lysable lorsqu'on la replace à 37°.

En présence de ces résultats, il n'est pas irrationnel de penser que la culture développée à froid et celle qui pousse à 37° diffèrent par leur métabolisme comme par leur morphologie et que la première cède la place à la seconde en subissant une lyse où un principe bactériophagique intervient. Ainsi la bactériophagie pourrait se comprendre, sans qu'il soit nécessaire de faire appel à un virus, comme étant l'expression des propriétés physiologiques jouant un rôle dans la variabilité.

### CHAPITRE III

#### Influence des immunsérums.

##### A. — BACILLE PYOCYANIQUE.

Un lapin reçoit, à une semaine d'intervalle, 4 injections, la première de 1/10 c. c., les 3 autres de 1/5 c. c. de culture sur gélose du bacille



pyocyanique (race lysable), âgée de vingt-quatre heures. On le saigne dix jours après la dernière injection, en même temps qu'un lapin neuf, dont le sérum sert de témoin. Les sérums sont chauffés une demi-heure à 56°. Dans deux tubes contenant respectivement 2 c. c. environ d'immunsérum et de sérum normal, on ensemence une trace de culture de la race lysable. On constate que l'immunsérum est agglutinant et entrave la production du pigment vert bleuâtre. De la culture en immunsérum on ensemence, après trois ou quatre jours, un nouveau tube d'immunsérum et on procède de même pour ce qui concerne la culture en sérum normal. On effectue ainsi 4 passages, après quoi on repique en strie sur gélose.

On ne constate aucune différence entre les deux géloses. Le microbe qui a passé par l'immunsérum forme une trainée qui se lyse et se recouvre de la pellicule d'aspect métallique. Il se comporte exactement ainsi comme le microbe qui a passé par le sérum normal. La culture provenant de l'immunsérum est soumise à la technique de l'isolement sur gélose. Toutes les colonies qui se développent montrent de la lyse et s'entourent du liséré brillant caractéristique. Chez aucun des individus microbiens, l'immunsérum ne fait donc disparaître l'aptitude à la lyse.

#### B. — BACILLE DE LISBONNE.

Avant de traiter de l'action des immunsérums, rappelons quelques détails relatifs à la lyse du bacille de Shiga sous l'influence du principe émanant du bacille coliforme de Lisbonne. Comme nous l'avons rappelé plus haut, les cultures de ce microbe élaborent toujours du principe lytique lorsqu'elles sont entretenues en milieu légèrement calcifié, condition très propice à l'apparition de la race R, spécialement investie du pouvoir lyso-gène.

Chauffons pendant une demi-heure, vers 60°, une telle culture en bouillon âgée de quelques jours. Dans un tube de bouillon qu'on vient d'ensemencer de bacille de Shiga, introduisons un peu du liquide chauffé, 1 goutte par exemple, et portons à l'étuve.

Dans les premières heures, le développement s'effectue sans entrave, le bouillon se trouble aussi nettement que dans un tube témoin semblablement ensemencé mais qui n'a pas reçu de liquide chauffé. Mais ce trouble, devenu intense, se dissipe bientôt, le bouillon peut redevenir complètement transparent, tandis que l'agent lytique y devient considérablement plus abondant et que, par contre, le témoin continue à se troubler. Cependant, on observe généralement que le lendemain le tube contenant le principe montre un nouveau trouble, plus ou moins intense, en raison de l'apparition de microbes doués d'une résistance qui se pro-



nonce davantage après deux ou trois repiquages. On peut se procurer ainsi une race parfaitement résistante qui, repiquée en strie sur gélose, développe une traînée tout à fait semblable à celle que produit l'ensemencement du bacille de Shiga normal. Si la résistance n'est pas encore totale, la traînée qui apparaît ne présente pas de vraies plages de lyse, mais s'éclaircit plus ou moins nettement.

L'activité du principe fourni par le bacille de Lisbonne n'est pas toujours la même. Comme l'un de nous l'a signalé autrefois, les cultures filles dérivant des colonies isolées peuvent donner des principes inégalement énergiques. Parfois deux ou trois passages en série sur le bacille de Shiga sont nécessaires pour qu'une clarification évidente s'observe. Parfois même, le bouillon ensemencé du bacille de Shiga et additionné d'un tel principe faible ne subit aucun éclaircissement après plusieurs passages. Il peut même devenir légèrement plus opaque que le bouillon témoin, en raison du fait que des microbes résistants troublant fortement le liquide apparaissent précocement et masquent complètement une lyse partielle et fugace.

En pareil cas, la lyse peut néanmoins se trahir si l'on étale sur gélose le bouillon ensemencé additionné de principe, renforcé, autant qu'il est susceptible de l'être, par un ou deux passages antérieurs en milieu liquide. Dans ces conditions, la traînée microbienne qui se développe présente à sa surface un piqueté lytique qui lui confère un aspect chagriné.

Si, avec une gouttelette de liquide lytique, on fait une strie à la surface d'une gélose sur laquelle on vient d'étaler I goutte de culture de bacille de Shiga, on obtient une traînée de clarification continue ou formée de taches transparentes, non confluentes, selon que le principe est plus ou moins concentré. La dimension des taches claires dépend aussi de la virulence du principe, elles sont plus petites si le principe est faible. Fait assez curieux, lorsque le gazon microbien se creuse de cupules lytiques, on constate souvent que la surface de ces dépressions se couvre promptement de poussière brillante à reflet métallique, tandis que le gazon normal n'en présente pas.

Il arrive, mais ce n'est pas régulier, qu'un principe faible devient brusquement plus actif au cours de passages ou bien à la suite de simples repiquages en série de la culture où des microbes résistants s'étaient développés. Ceux-ci subissent alors une lyse passagère après laquelle la résistance s'affirme davantage et ne permet plus aucune lyse.

Si l'on soumet à la technique de l'isolement une culture de microbes bien résistants et si l'on repique des colonies séparées, il arrive parfois que certaines de celles-ci ne sont pas lysogènes. Mais on obtient le plus souvent des cultures filles douées d'un



pouvoir lysogène qui se maintient même si l'on pratique de nouveaux isolements. Ces cultures lysogènes parfaitement résistantes ont un aspect normal et ne montrent aucun indice de lyse. Les cultures en bouillon de ces bacilles de Shiga lysogènes, filtrées ou chauffées une demi-heure à 58°, ou traitées par le chloroforme, fournissent un principe très actif.

Des tubes de bouillon reçoivent 1 goutte de ce principe, puis sont ensemencés de bacille de Shiga. Après quelques heures, le trouble qui s'était produit disparaît. Deux jours plus tard, on chauffe à 58° ces cultures lysées et on les utilise pour la vaccination de lapins. Saigné neuf jours après la dernière injection, un lapin qui a reçu 7 injections de 1 à 2,5 c. c. de ce principe fournit un sérum dont deux volumes neutralisent complètement et définitivement un volume de liquide lytique. Le sérum neutralise de même façon le principe existant dans une culture lysée de bacille de Shiga et celui qui s'est produit dans une culture de microbe lysogène, c'est-à-dire soit du microbe coliforme de Lisbonne, soit du bacille de Shiga adapté au principe de Lisbonne.

L'expérience instituée en vue de rechercher si le pouvoir lysogène d'un microbe tel que le bacille de Lisbonne peut disparaître lorsqu'on cultive celui-ci dans l'immunsérum correspondant a été réalisée pour la première fois dans notre laboratoire, en 1925, par Mac Kinley [45]. Elle a donné un résultat négatif. On ne réussit pas à éliminer le pouvoir lysogène, bien que l'agent lytique soit neutralisé par le sérum. Reporté sur milieu nutritif ordinaire, le bacille reprend son activité première. Cette notion ne paraît pas favorable à la théorie du virus. Elle a été confirmée ultérieurement, et de la façon la plus nette, par Burnet [46].

Dans un tube contenant environ 2 c. c. de l'immunsérum qui, ainsi qu'il est dit plus haut, neutralise un demi-volume de principe, introduisons 1 goutte de culture en bouillon, que l'on vient de diluer cent fois, de bacille lysogène de Lisbonne, et ensemençons de même du sérum normal de lapin. Pratiquons ainsi, à trois ou quatre jours d'intervalle, 4 passages par l'immunsérum ou le sérum normal, puis repiquons le dernier passage sur gélose, et de là en bouillon. Repiquons encore en bouillon cette dernière culture, et après quelques jours, chauffons à 60°. L'épreuve sur bacille de Shiga montre que les deux liquides contenant le bacille de Lisbonne qui a passé soit par le sérum normal, soit par l'immunsérum, sont lysogènes et le sont exactement avec la même énergie.

Nous avons reproduit cette même expérience en la faisant porter cette fois sur une culture résistante et lysogène de bacille de Shiga, dérivant d'une colonie isolée ainsi qu'il est dit plus haut. Cette fois encore, le résultat a été négatif. Le pouvoir lyso-



gène qui s'est communiqué au bacille de Shiga n'y est pas aboli par l'immunsérum, malgré 5 passages successifs.

Pour rendre cette expérience plus convaincante, il convient de faire agir comparativement l'immunsérum sur une trace de la même culture lysogène, celle-ci étant soit vivante, soit stérilisée par chauffage.

Une culture en bouillon de bacille de Shiga lysogène, laissée six jours à l'étuve, est divisée en deux parties, dont l'une est stérilisée par chauffage d'une demi-heure à 58°. On introduit dans 2 tubes stériles XX gouttes d'immunsérum antilytique chauffé à 56°. Semblablement, 2 tubes stériles reçoivent XX gouttes de sérum, également chauffé à 56° de lapin neuf. Dans l'un des tubes contenant l'immunsérum et dans l'un des tubes contenant le sérum normal, on introduit II gouttes de culture de bacille de Shiga lysogène, stérilisée à 58°. Dans les deux autres tubes, on introduit 1/50 de goutte de cette même culture, mais qui n'a pas été stérilisée. On mélange soigneusement. Après une demi-heure, on ajoute à chacun des 4 tubes 5 c. c. de bouillon stérile. Les 2 tubes qui ont reçu II gouttes de culture lysogène stérilisée (et qui contiennent soit du sérum normal, soit de l'immunsérum) sontensemencés de 1/50 de goutte de culture en bouillon de bacille de Shiga normal, de même âge que la culture lysogène, et laissée comme elle six jours à l'étuve. Enfin, un tube de bouillon (5 c. c.) estensemencé de 1/50 de goutte de la culture de bacille de Shiga lysogène, et un autre d'une même quantité de la culture de bacille de Shiga normal.

Une lyse typique s'observe bientôt dans le tube qui,ensemencé de bacille de Shiga normal, contient le principe stérilisé et le sérum normal ; aucune lyse ne se produit dans le tube identique sauf qu'il contient de l'immunsérum, ni, cela va sans dire, dans les autres tubes, où il n'y a pas coexistence de principe et de microbes sensibles. Ces cultures sont laissées trois jours à l'étuve, puis repiquées parensemencement de II gouttes en bouillon. Les cultures filles ainsi obtenues sont également maintenues plusieurs jours à l'étuve puis repiquées en bouillon ; on pratique de la sorte 4 passages successifs. Après repiquage, on chauffe à 58° ces 5 séries de cultures, soit les cultures initiales en présence de sérum et les 4 séries de cultures qui en sont dérivées par repiquages successifs. On éprouve l'activité lytique des liquides ainsi chauffés à l'égard du bacille de Shiga, en ajoutant III gouttes du liquide à un tube de bouillon additionné de I goutte de solution de chlorure calcique à 1 p. 100, etensemencé de bacille de Shiga normal. Cette épreuve montre que la neutralisation par l'immunsérum du principe chauffé est définitive : la culture développée en présence de principe chauffé et de sérum antilytique, et les 4 cultures qui en dérivent, ne manifestent aucune activité lytique, tandis qu'un pouvoir lytique bien accusé persiste au cours des passages successifs dans les cultures déri-



vées de celle qui contenait du principe stérilisé et du sérum normal. Par contre, le pouvoir lytique du bacille de Shiga lysogène, mis vivant en présence de sérum antilytique, n'est que momentanément déprimé par le contact avec ce sérum : fortement réduite dans la culture initiale contenant l'immunsérum, l'activité lytique se relève rapidement et progressivement au cours des passages successifs en bouillon, pour devenir, dès le troisième passage, égale à l'activité lytique de la culture dérivée de celle où le bacille lysogène s'était développé en présence de sérum normal.

Cette expérience conduit à des résultats analogues si on la fait porter sur le microbe lysogène de Lisbonne.

#### CHAPITRE IV

##### Influence comparée du calcium sur la lyse et sur le pouvoir lysogène.

On sait que la lyse par le principe que produit le microbe de Lisbonne exige le concours du calcium, à tel point qu'elle ne s'effectue guère en bouillon ordinaire, dont l'alcalinisation a précipité une très grande partie du calcium sous forme de phosphate tricalcique. Aussi les expériences de lyse portant sur ce principe sont-elles toujours pratiquées en tubes de bouillon additionné à froid de I goutte de solution de chlorure calcique à 1 p. 100. Il est intéressant, à cet égard, de rechercher si le calcium est également nécessaire à la production du principe par le microbe lysogène et à sa régénération par le microbe sensible. Pour n'avoir affaire qu'à une seule et même espèce microbienne, nous avons employé comme microbe lysogène le bacille de Shiga adapté à ce principe, le microbe sensible utilisé étant le bacille de Shiga normal.

On laisse à l'étuve à 37°, pendant six jours, 2 cultures en bouillon, l'une de bacille de Shiga normal, l'autre de bacille de Shiga lysogène. Celle-ci, au sortir de l'étuve, est divisée en deux portions, dont l'une est chauffée à 58° pendant une demi-heure (soit L58). 3 tubes de bouillon additionnés de XII gouttes de solution d'oxalate sodique à 2,5 p. 100 sont ensemencés, l'un de 1/50 de goutte de la culture vivante de bacille de Shiga lysogène, les 2 autres de 1/50 de goutte de la culture de Shiga normal : parmi ces deux derniers, l'un a préalablement reçu II gouttes de L58. On opère de même sur 3 autres tubes de bouillon additionné, au lieu d'oxalate sodique, de I goutte de chlorure de calcium à 1 p. 100 et de XI gouttes de solution physiologique de NaCl. La culture en bouillon calcique additionné du principe L58 et ensemencé de bacille de Shiga est complètement lysée après neuf heures ; les 5 autres cultures demeurent indéfiniment troubles : comme on pouvait s'y attendre, le principe L58 n'a pas



lysé le bacille de Shiga en bouillon oxalaté. Les 6 cultures sont sorties de l'étuve après sept jours. A ce moment on les repique par ensemencement de II gouttes en bouillon correspondant, c'est-à-dire oxalaté pour celles du premier lot, calcifié pour celles du second ; on excepte toutefois de ce repiquage les 2 cultures témoins de bacille de Shiga normal non additionnées de principe ; on effectue de la sorte 3 repiquages consécutifs, à une semaine d'intervalle. On dispose ainsi, d'une part, de bacille de Shiga lysogène ayant fait plusieurs passages soit en milieu oxalaté, soit en milieu calcique et, d'autre part, de cultures issues de l'action du principe sur le bacille de Shiga normal, en absence ou en présence de calcium.

Pour rechercher la présence de principe dans ces cultures, chauffons-les à 58° pendant une demi-heure, et introduisons III gouttes du liquide chauffé dans un tube de bouillon calcifié que l'on ensemence de bacille de Shiga. Lorsque le liquide chauffé est une culture en bouillon oxalaté, il est nécessaire, pour compenser l'oxalate introduit, d'ajouter au tube de bouillon II gouttes de solution de chlorure calcique à 1 p. 100. Le précipité qui apparaît dans ces conditions pouvant masquer la lyse, il convient de pratiquer sur les cultures ainsi obtenues une nouvelle épreuve calquée sur la précédente. Ces cultures sont chauffées à 58° et introduites à raison de III gouttes dans un tube de bouillon calcifié que l'on ensemence de bacille de Shiga : tous les liquides chauffés étant cette fois pourvus de calcium, il suffit d'ajouter uniformément, aux tubes de bouillon qui en reçoivent III gouttes, I goutte de solution de chlorure calcique à 1 p. 100 ; dans ces conditions la lyse apparaît clairement. Or la lyse survient uniquement dans les cultures additionnées de liquide provenant, soit de cultures oxalatées ou calcifiées de bacille de Shiga lysogène, soit de cultures issues de l'action du principe sur le Shiga normal en milieu calcique ; elle y est totale six heures après l'ensemencement. Par contre, les liquides dérivés de la culture de Shiga normal soumise à l'action du principe en présence d'oxalate sodique se montrent régulièrement privés de pouvoir lytique. Il est donc établi que l'addition d'oxalate au milieu de culture empêche la régénération du principe de Lisbonne par la bactérie sensible, tout en permettant sa production par la bactérie lysogène.

### Résumé.

1° Les cultures du type S du colibacille lysogène de Lisbonne se recouvrent sur gélose d'une pellicule luisante d'aspect métallique et se dissocient en donnant lieu à l'apparition d'une variété R, qui se développe en cultures minces à surface terne. C'est dans la variété R que l'on décèle le pouvoir lysogène. La dissociation  $S \rightarrow R$  est favorisée par une légère teneur du milieu



en calcium, elle est entravée par l'addition d'oxalate de soude, mais elle l'est aussi par celle d'un excès de chlorure calcique. L'élimination du calcium par l'oxalate de soude protège les microbes contre la diminution de colorabilité qui semble dénoncer un processus autolytique et qui, en milieu calcique, affecte surtout le type S.

2° Les cultures de bacille pyocyanique sujettes à la lyse développent, par ensemencement en strie sur gélose, une trainée blanchâtre, saillante et assez opaque, s'entourant bientôt d'un mince liséré qui se revêt d'une pellicule d'aspect métallique. La trainée centrale, qui d'abord semblait indemne, présente bientôt des cupules de lyse et se recouvre peu à peu de la poussière brillante dont le liséré est revêtu. Il semble donc que le type microbien apte à se développer sous forme de liséré est responsable de la lyse secondaire affectant la trainée blanchâtre centrale.

La trainée centrale se lyse plus promptement si l'ensemencement a été pratiqué aux dépens d'une culture déjà vieille ou, mieux encore, si, préalablement à l'ensemencement en strie, on a étalé sur la surface entière de la gélose I goutte de culture âgée d'une variété non lysable : il existe donc, dans les cultures âgées, des produits qui hâtent la lyse de la race sensible.

Le repiquage de la matière microbienne prélevée au niveau du liséré développe parfois sur gélose une culture fabriquant beaucoup plus abondamment le pigment vert bleuâtre et manifestant d'emblée une lyse intense. La race ainsi obtenue, possédant au plus haut degré l'aptitude à la lyse, se maintient dans le bouillon ordinaire, tandis qu'elle se raréfie progressivement par entretien en bouillon oxalaté, où la race réfractaire à la lyse ne tarde pas à prédominer. La privation de calcium, qui entrave l'apparition de la variété lysogène du bacille de Lisbonne, s'oppose donc d'autre part au maintien de la variété de bacille pyocyanique particulièrement apte à la lyse.

3° Lorsqu'on le cultive en strie sur gélose à une température de 10-12°, le bacille de Lisbonne forme une trainée saillante et glaireuse qui ne présente pas le reflet métallique des cultures développées à 37°. Cette culture n'est pas lysogène. Si, après développement à cette température basse, on la porte à 37°, dès le lendemain la trainée s'affaisse en se recouvrant de la pellicule luisante. Cette modification d'aspect correspond à la lyse de la culture développée à froid, à laquelle se substitue une nouvelle génération microbienne morphologiquement différente de la précédente ; elle s'accompagne en outre de l'apparition du pouvoir lysogène. On a ainsi l'impression que la race développée à chaud est antagoniste de celle développée à froid, et que cet antagonisme s'exprime par un pouvoir lytique.

4° La culture à température basse exerce, sur le bacille pyo-



cyanique, des effets singulièrement analogues à ceux qu'elle produit sur le bacille de Lisbonne. Cultivée à 10-12°, la race lysable du pyocyanique ne montre ni lyse, ni production de pigment ; elle développe une trainée grasse, assez saillante et blanchâtre. Mais si on la reporte à 37°, il suffit d'un ou deux jours de séjour à cette température pour que cette trainée développée à froid s'affaisse et se recouvre de taches de lyse à reflet métallique, tandis que le pigment vert bleuâtre apparaît. Comme dans le cas du bacille de Lisbonne, le transfert à 37° détermine la lyse de la culture développée à froid, tandis qu'une nouvelle génération microbienne apparaît, morphologiquement distincte de la précédente. Dans le cas du bacille pyocyanique, les modifications déterminées par le transfert à l'étuve ne s'observent pas si le milieu a été privé de son calcium par addition d'oxalate de soude.

5° Des passages répétés en immunsérum de lapin n'affectent aucunement l'aptitude du bacille pyocyanique à la lyse. Le sérum antilytique obtenu par immunisation du lapin contre des cultures de bacille de Shiga lysées par le principe du colibacille lysogène de Lisbonne neutralise définitivement ce principe, mais n'enlève pas son aptitude lysogène au microbe de Lisbonne, ni au bacille de Shiga adapté qui, devenu résistant à ce principe, a acquis la propriété de l'élaborer.

6° L'addition d'oxalate sodique au milieu de culture empêche la lyse du bacille de Shiga par le principe de Lisbonne et la reproduction de ce principe par cette bactérie, sans enlever au microbe lysogène l'aptitude à le produire.

### Conclusions.

Ce mémoire met en évidence des analogies frappantes entre la lysogénèse du microbe coliforme de Lisbonne et celle des cultures de bacille pyocyanique sujettes à la lyse. Dans l'un et l'autre cas, l'aptitude lysogène est en relation étroite avec la variabilité microbienne et, comme celle-ci, sous la dépendance de la teneur en calcium du milieu de culture. La culture à basse température (10-12°) prévient dans les deux cas l'apparition du pouvoir lysogène, lequel se développe aussitôt que la culture est portée à 37°, en même temps qu'apparaît une nouvelle génération microbienne, morphologiquement distincte de celle qui s'était développée à froid. L'immunsérum spécifique n'enlève pas plus au bacille pyocyanique qu'au microbe de Lisbonne l'aptitude lysogène, bien que, dans le cas du bacille de Lisbonne, il neutralise définitivement le principe lytique déjà formé.

Tout se passe en somme comme si le principe lytique était un élément constitutif normal du microbe lysogène, élément dont



la formation par la bactérie est, au même titre que la constitution antigénique du microbe, influencée par la variabilité. Sa production peut être empêchée par certains facteurs, par exemple par la culture à basse température, mais la bactérie garde la potentialité de l'élaborer, et le produit à nouveau lorsque l'influence inhibitrice a pris fin. De même l'immunsérum, bien que neutralisant le principe complètement et définitivement, n'enlève pas au microbe la potentialité de le fabriquer. Peut-être aussi le principe lytique, contenu à l'intérieur du microbe lysogène et se multipliant avec lui, y échappe-t-il à l'action antagoniste de l'immunsérum, auquel seul le principe extrabactérien serait sensible. L'addition d'oxalate de soude au milieu de culture empêche la régénération du principe de Lisbonne par la bactérie sensible, sans entraver sa formation par la bactérie lysogène : peut-être l'agression de la bactérie sensible exige-t-elle la présence de calcium, sans que celui-ci soit nécessaire à la reproduction du principe lytique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] DA COSTA CRUZ. — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **94**, 840. — *Ib.*, 1925, **93**, 875.
- [2] GILDEMEISTER. — *Centralbl. Bakt.*, 1924, **93**, 412.
- [3] BORDET (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 403.
- [4] BORDET (J.) et BORDET (P.). — *Schweiz. Zeitschr. f. Path. u. Bakt.*, 1941, **4**, 321.
- [5] BORDET (J.) et BORDET (P.). — *Bull. Acad. Méd. de Belgique*, 1941, 617.
- [6] BORDET (J.) et RENAUX (E.). — *Ces Annales*, 1930, **45**.
- [7] BORDET (P.). — *Ces Annales*, 1930, **44**, 26.
- [8] BLANC (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 52.
- [9] QUIROGA. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 363.
- [10] HAUDUROY et PEYRE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88**, 688.
- [11] HADLEY. — *J. infect. Dis.*, 1924, **34**, 260.
- [12] BORDET (J.). — *Toulouse Médical*, septembre 1929.
- [13] HORSTER. — *Zeitschr. Hyg.*, 1931, **112**, 178.
- [14] BORDET (P.) et BEUMER (I.). — *Schweiz. Zeitschr. f. Path. u. Bakt.*, 1942, **5**, 265.
- [15] KINLEY (MAC). — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1050.
- [16] BURNET (F. M.). — *J. Path. a. Bact.*, 1932, **35**, 851.



## RECHERCHES SUR LES CORYNEBACTÉRIES DE L'HOMME

par MAURICE WELSCH, G. DEMELENNE-JAMINON et J. THIBAUT (\*).

(Institut de Bactériologie et Parasitologie  
de la Faculté de Médecine de l'Université de Liège.)

(Suite.)

### C. — ETUDE DES PROPRIÉTÉS DES DIPHTÉROÏDES.

1° PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES. — a) *Fermentation des hydrates de carbone usuels et classification.* — La recherche de la fermentation des sucres suivants : glucose, galactose, maltose, saccharose, lactose, dextrine et mannite, nous a permis de classer, sans aucune difficulté, nos différentes souches, dans les sections et groupes fermentaires décrits par Barratt [3]. Nous n'avons cependant isolé aucun représentant de certains groupes (II, IV, VI, IX), et 4 souches, inclassables dans les catégories de cet auteur, ont formé trois nouveaux groupes (VIIa, VIIIa, XII).

Le tableau II montre quels sont les caractères biochimiques des divers groupes, le nombre de souches de chacun d'eux observé par Barratt, puis par nous, et, enfin, l'origine de nos divers diphtéroïdes.

Il n'y a aucune relation entre le groupe fermentaire et l'origine des souches ; en effet, si on ne tient pas compte des groupes Va, VIIIa, X et XII qui n'ont chacun qu'un seul représentant, ni du groupe VIIa, qui n'en a que deux, on constate que les autres groupes contiennent chacun des représentants isolés de la gorge, du nez et des oreilles. Il est, cependant, intéressant de constater que la plupart des souches qui constituent un groupe, à elle seule ou à deux, proviennent du nez.

La fréquence des germes du groupe afermentaire XI (groupe de *C. Hofmanni*) est, de loin, la plus élevée ; ils représentent 56,3 p. 100 des diphtéroïdes isolés ; les autres diphtéroïdes, considérés ensemble, ne sont cependant pas rares, même dans les angines aiguës.

On peut remarquer que 16 de nos souches, appartenant aux

(\*) Voir ces *Annales*, 1946, 72, 203.





groupes V et Va, ne se différencient de *C. diphteria*, au point de vue de leurs aptitudes fermentaires, que par la non fermentation de la dextrine. L'étude de leurs cultures sur gélose simple ou G.C.T. montre, cependant, qu'il s'agit bien de diphtéroïdes. Trois au moins d'entre eux peuvent, microscopiquement, prêter à confusion avec le bacille de Loeffler ; or, l'emploi d'un milieu « différentiel » additionné de glucose ou de saccharose n'aurait aucunement aidé à leur identification, au contraire. Il en est de même pour deux souches, au moins, du groupe III, qui, microscopiquement assez semblables à *C. diphteria*, s'en distinguent biochimiquement par la non fermentation du galactose et de la dextrine. Ici encore, en cas de doute, l'emploi isolé des hydrates de carbone les plus utilisés dans les milieux « différentiels » n'auraient eu pour résultat que d'augmenter les chances de diagnostic erroné. La substance fermentescible qui paraît la plus indiquée pour aider, à elle seule, au diagnostic différentiel rapide, pratique entre *C. diphteria* et l'ensemble des diphtéroïdes est la dextrine ; ce polysaccharide est, en effet, attaqué par tous nos bacilles diphtériques, tandis que 4 diphtéroïdes de notre collection et un seul de celle de Barratt étaient capables de le fermenter.

b) *Propriétés communes à toutes les souches.* — Toutes les souches étudiées présentent en commun les propriétés suivantes : elles ne fermentent ni l'amidon, ni le glycogène ; ne forment pas d'indol (réaction d'Ehrlich), mais, quelques-unes, de l'acide indol-acétique (réactif de Salkowski) ; elles sont anhémostatiques ; elles ne liquéfient pas le sérum coagulé ; elles ne produisent pas de pigment ; elles sont aérobies (strictement ou facultativement). Aucune tentative n'a été faite pour isoler des espèces anaérobies. Leur toxicité pour l'animal [4, 40] n'a pas été recherchée.

c) *Cultures en gélose glucosée profonde.* — La plupart des corynébactéries étudiées se développent uniquement dans la portion supérieure du tube de Veillon. Cependant, quelques souches (15 p. 100 environ) croissent dans toute la hauteur du milieu de culture, exactement comme *C. diphteria*.

La valeur différentielle de la culture en gélose de Veillon, pour la distinction pratique entre *C. diphteria* et les « diphtéroïdes » est donc loin d'être absolue. La recherche faite en gélose profonde saccharosée avec indicateur n'a pas beaucoup plus de valeur ; car, parmi les organismes qui croissent en profondeur, comme le bacille de Loeffler, on trouve 38 p. 100 des représentants du groupe V qui, comme le bacille de Loeffler, n'attaquent pas le saccharose.

Parmi les groupes comportant plusieurs représentants dans notre collection, les III, VII et XI contiennent exclusivement des souches strictement aérobies.

d) *Fermentation de l'urée.* — Nous avons vu qu'en accord avec

les observations de Puschel [41] et de Kleinsorgen et Commichau [24] nos souches de *C. diphtheriæ* ne fermentaient pas l'urée. Mais, si la plupart de nos diphtéroïdes sont capables d'alcaliniser en vingt-quatre ou quarante-huit heures le milieu de Hiss additionné de 2 p. 100 d'urée, par contre 21 p. 100 d'entre eux n'ont aucune action sur cette substance et se comportent, par conséquent, à ce point de vue, comme le bacille de Loeffler. La valeur différentielle particulière attribuée à ce caractère n'est donc pas absolue [49].

A l'exception du groupe I, dont tous les membres attaquent l'urée, et du groupe III, dont aucun ne la fermente, tous les groupes comportant plusieurs représentants contiennent des souches actives et d'autres inactives à l'égard de cette substance.

2° PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES. — a) *Cultures sur gélose ordinaire*. — Ensemencés en stries sur gélose ordinaire (bouillon de bœuf gélifié à 2 p. 100, ajusté à pH 7,4) les diphtéroïdes donnent, soit une culture grêle, grisâtre, rappelant celle de *C. diphtheriæ* dans les mêmes conditions (34 p. 100), soit, au contraire, une culture abondante et vigoureuse (66 p. 100). Parmi ces derniers, beaucoup donnent une culture lisse, brillante, humide, crémeuse, bombée (85 p. 100), mais quelques autres donnent une culture granuleuse, mate, sèche, grisâtre, tantôt saillante (12 p. 100), tantôt très plate (3 p. 100).

Les cultures abondantes sont dominantes dans les groupes I (83 p. 100), V (77 p. 100) et VIII (95 p. 100); tandis que les cultures grêles dominent dans le groupe III (75 p. 100) et qu'un nombre à peu près égal de souches de l'un et de l'autre type se rencontre dans les groupes VII et XI.

Les cultures sèches n'ont été observées que dans les trois groupes III (25 p. 100), V (15 p. 100) et surtout VIII (32 p. 100).

b) *Cultures sur sérum coagulé*. — Sur sérum de bœuf coagulé par la chaleur, les cultures en stries sont plus homogènes que sur gélose; la croissance plus luxuriante rend difficile la distinction entre culture abondante ou grêle; par contre, les cultures sèches se distinguent encore des cultures lisses.

c) *Cultures en bouillon*. — Les souches qui, sur gélose, donnent une culture grêle, forment ici un léger trouble grumeleux qui se dépose plus ou moins rapidement; celles qui donnent une culture abondante et lisse forment un trouble homogène avec dépôt pulvérulent; enfin, celles qui donnent une culture abondante granuleuse et sèche, forment ici un trouble grumeleux qui se dépose rapidement. Dans les trois cas, on peut observer la présence d'un voile superficiel, généralement fragile.

d) *Aspect microscopique après culture sur G.C.T.* — Six aspects différents peuvent être schématiquement décrits. La plupart des



diphthéroïdes étudiés se colorent d'une façon intense et massive par le bleu de toluidine, avec, parfois, une bande médiane, transversale, qui reste claire; on peut distinguer parmi les individus ainsi colorés des formes courtes moyennes et longues. Les premières ont un aspect diplococcique, les secondes, l'aspect du bacille de Hofmann classique, et, les dernières, l'aspect d'un bacille de Loeffler qui serait coloré de façon homogène. A côté des bacilles massivement colorés, il faut distinguer ceux qui, comme *C. diphtheriæ*, prennent irrégulièrement la couleur et montrent des granulations plus ou moins nombreuses dans un protoplasme resté clair; ici encore, nous distinguerons des formes courtes granuleuses, moyennes granuleuses et longues granuleuses.

Les formes non granuleuses sont dominantes (77 p. 100); les formes courtes et moyennes sont les plus nombreuses (respectivement 40 et 53 p. 100); tandis que les premières se rencontrent exclusivement dans le groupe I et dominent dans les groupes VII et VIII, les secondes sont en majorité dans le groupe XI, elles sont réparties à peu près également dans les groupes III et V. Enfin, les formes longues ont été observées, à une exception près, dans le seul groupe XI.

L'examen microscopique des cultures sur G.C.T. ne sera généralement pas utile, pour le diagnostic différentiel entre *C. diphtheriæ* et les diphthéroïdes; toutefois, l'observation de formes longues granuleuses pourra être prise en considération, étant donné la rareté de cet aspect chez les diphthéroïdes cultivés sur G.C.T. (3 souches sur 105). Nous avons vu que les formes longues se rencontrent surtout chez *C. diphtheriæ* var. *mitis*; dans la pratique, l'examen microscopique ne sera donc indiqué que pour l'identification des colonies de ce type, lorsque la morphologie macroscopique sera insuffisante. Nous verrons plus loin que ce sera parfois le cas, tandis que, pour le *gravis*, cette éventualité est heureusement très rare.

e) *Aspect microscopique après culture sur sérum coagulé.* — Cultivés sur sérum coagulé, nos diphthéroïdes présentent des aspects analogues à ceux qu'ils montrent sur G.C.T. Cependant, ils seront généralement plus longs; les formes courtes coccoïdes sont exceptionnelles, les formes moyennes les plus fréquentes et les formes longues pas très rares.

f) *Cultures sur G.C.T.* — Bien que le diagnostic macroscopique de la diphtérie soit en usage depuis plusieurs années, il ne semble pas qu'on ait étudié systématiquement l'aspect des colonies de diphthéroïdes sur les milieux utilisés dans ce but. La plupart des auteurs signalent que les « diphthéroïdes » se distinguent macroscopiquement de *C. diphtheriæ* et en décrivent un ou deux aspects, différenciant l'un de l'autre par l'intensité du pouvoir réducteur

seulement. Whitley [54], toutefois, signale que les colonies de diphtéroïdes sont assez variables ; mais il ne donne qu'une description très sommaire des types observés. La question est cependant importante ; il est indispensable, avant d'utiliser un milieu pour le diagnostic macroscopique pratique, de savoir exactement sous quel aspect se présenteront les divers diphtéroïdes et dans quelle mesure il sera possible de les distinguer, avec certitude, du bacille de Loeffler.

Nous avons ensemencé nos 105 souches sur G.C.T., en boîtes de Pétri, de façon à obtenir des colonies isolées ; l'examen de celles-ci nous a révélé l'existence de 5 types extrêmement différents les uns des autres ; nous les désignerons par les lettres H, V, X, Y et Z. Le tableau III montre leur répartition dans les divers groupes fermentaires.

TABLEAU III. — Morphologie des diphtéroïdes sur G. C. T.

GROUPES	ASPECT DES COLONIES SUR G. C. T.					
	H	V	X	Y	Z	Total
I. . . . .	6	0	0	0	0	6
III. . . . .	0	1	3	0	0	4
V. . . . .	11	2	0	0	0	13
Va. . . . .	1	0	0	0	0	1
VII. . . . .	4	0	4	1	0	9
VIIa. . . . .	0	0	1	1	0	2
VIII. . . . .	14	5	1	0	2	22
VIIIa. . . . .	1	0	0	0	0	1
X. . . . .	1	0	0	0	0	1
XI. . . . .	45	0	0	0	0	45
XII. . . . .	0	0	1	0	0	1
Total. . . . .	83	8	10	2	2	105

Le type H est, de loin, le plus fréquent (79 p. 100) ; les types V et X ont été observés assez souvent (7,6 et 9,5 p. 100), tandis que les types Y et Z sont nettement plus rares (1,9 p. 100 chacun).

Sauf pour le type Z, qui n'a été observé que chez deux individus du groupe VIII, les aspects morphologiques ne présentent pas de relations étroites avec les propriétés fermentaires. Le type H a été rencontré dans tous les groupes comportant plusieurs représentants, sauf, toutefois, dans le groupe III ; il est seul existant dans les groupes I et XI (et aussi Va, VIIIa et X qui n'ont chacun qu'un seul représentant dans notre collection) ; il correspond aux colonies décrites par différents auteurs comme caractéristiques de *C. Hofmanni*, d'où sa désignation par la lettre H. Les autres types ont été désignés par les dernières



lettres de l'alphabet, sans préjuger en rien de leur signification.

Les trois types les plus fréquents, H, V et X, ont été rencontrés dans diverses situations anatomiques (gorge, nez, oreilles) et différentes circonstances cliniques (malades, convalescents, porteurs). Par contre, les deux types plus rares, Y et Z, n'ont été observés qu'avec des souches isolées du nez.

Les types X et Y donnent tous des cultures grêles sur gélose ordinaire ; des cultures analogues sont également obtenues avec quelques types H.

Au contraire, tous les types V et Z, et ceux-là seulement, donnent, sur gélose ordinaire, des cultures abondantes mais sèches ; les premiers, des cultures saillantes, les seconds, des cultures plates.

Ces deux types sont encore caractérisés par leur morphologie microscopique : à une exception près (V), ils ont tous l'aspect moyen granuleux et se distinguent du bacille de Loeffler par leur épaisseur plus considérable. Les types X et Z, par contre, n'ont pas d'aspect microscopique constant.

Tandis que les types X, Y et Z sont tous aérobies stricts, quelques types V poussent dans toute la hauteur du tube de Veillon.

Enfin, tous les types X sont inactifs sur l'urée, tandis que les types Z fermentent ce corps et que les types V et Y comportent à la fois des représentants actifs et inactifs.

Quant aux types H, ils ne présentent aucune de ces propriétés d'une manière constante.

Les différents types de colonies observés sont stables, nos souches ont été examinées à diverses reprises en l'espace de plusieurs mois et le même aspect a été constamment retrouvé pour chacune d'elles. Dès qu'une souche était parfaitement purifiée et présentait des propriétés fermentaires constantes, son aspect morphologique aussi était uniforme et stable. Il n'y a donc pas lieu de considérer les types observés comme des mutants.

La description des 5 types de colonies ci-dessous est illustrée par les figures 4 à 8 de la planche (voir mémoire précédent).

*Type H* (fig. 4). — En vingt-quatre heures, ces colonies ont un diamètre de 1 à 2 mm. Elles sont circulaires, bombées, lisses, à contour régulier ; tandis que les unes, plus réductrices, sont grises ou même noires, les autres sont, au contraire, blanches. Après quarante-huit heures, leur diamètre atteint 5 mm. ; toutes sont alors noires ; souvent, la périphérie est intensément colorée en noir, tandis que le centre reste gris. Après incubation prolongée, la surface perd sa régularité et se plisse plus ou moins.

Ces colonies ressemblent assez bien à celles de *C. diphtheriae* var. *mitis* ; cependant, elles n'ont pas l'aspect brillant de ce dernier ni sa bordure périphérique translucide caractéristique. Néanmoins, le

diagnostic différentiel sera, parfois, difficile par le seul examen macroscopique ; nous avons vu que la microscopie habituelle du *mitis*, bacilles longs, très granuleux, est très rarement observée chez les diphtéroïdes et permet, par conséquent, la distinction dans les cas douteux.

*Type V* (fig. 5). — En vingt-quatre heures, ces colonies ont 1 à 2 mm. de diamètre. Elles sont circulaires, saillantes, granuleuses, à contour découpé, de forme générale conique, grises ou noires d'emblée. Après quarante-huit heures, leur diamètre atteint 4 mm. ; elles sont nettement réductrices. Elles se distinguent de *C. diphteria* var. *intermedius* par l'absence de région centrale surélevée en petit cône ; d'autre part, l'absence de striation radiaire et de bordure périphérique aplatie permet de les différencier du *gravis*.

Au début de nos recherches, néanmoins, et avant que nous n'ayons individualisé les divers types de diphtéroïdes, ces colonies V ont été parfois considérées comme des *gravis*.

*Type X* (fig. 6). — Ces colonies sont de très petite taille ; en vingt-quatre heures, leur diamètre atteint 0,5 à 1 mm. et 3 mm. après quarante-huit heures. Elles sont polygonales, plates, rugueuses, à contour lobulé ; peu réductrices, elles restent blanches ou légèrement grisâtres. Après quarante-huit heures, le bord de la colonie est surélevé et lui donne un aspect très caractéristique.

Lorsque ces colonies sont nombreuses et rapprochées les unes des autres, un examen superficiel pourrait les faire considérer comme des *gravis* encore peu développés ; nous avons commis cette erreur au début de nos recherches : la révision de la culture après quarante-huit heures montre toujours très nettement qu'il ne peut s'agir de *C. diphteria*.

*Type Y* (fig. 7). — Ces colonies sont aussi de très petite taille ; leur diamètre ne dépasse généralement pas 0,5 mm. Elles sont circulaires, bombées, lisses et brillantes, à bord entier, habituellement grises. Leur aspect général est, en fait, celui d'un type H nain. Elles ne prêtent nullement à confusion avec les diverses variétés du bacille de Loeffler.

*Type Z* (fig. 8). — Ces colonies sont extrêmement caractéristiques ; leur diamètre atteint jusqu'à 5 mm. ; elles sont plus ou moins arrondies avec un contour très découpé, rugueuses, mates, sèches et, surtout, très plates et très noires, avec périphérie grise. Elles ne peuvent, non plus, causer aucune difficulté pour le diagnostic.

### 3° CONCLUSIONS DES RECHERCHES RELATIVES AUX DIPHTÉROÏDES. —

1° L'étude des fermentations en milieu de Hiss contenant divers hydrates de carbone nous a permis de classer 154 corynébactéries dans les groupes fermentaires décrits par Barratt ; 4 souches, seulement, inclassables dans ces catégories, ont dû former trois nouveaux groupes.

2° Il n'y a aucune relation entre le type fermentaire et l'origine de la souche.

3° Si les diphtéroïdes dépourvus de toute activité sur les hydrates de carbone (groupe de *C. Hofmanni*) sont, de loin, les



plus fréquents dans le rhino-pharynx humain, le nombre des autres diphtéroïdes n'est, cependant, pas négligeable ; ils représentent, en effet, 43,7 p. 100 des souches isolées.

4° Tous les diphtéroïdes étudiés étaient dépourvus de pouvoir hémolytique, d'action sur l'amidon et le glycogène et de capacité indologène.

5° Environ 15 p. 100 de ces souches croissent dans toute la hauteur de la gélose glucosée de Veillon. Enfin, 5 p. 100 croissent dans toute la hauteur de la gélose profonde saccharosée tournesolée sans produire de virage.

6° Environ 20 p. 100 des diphtéroïdes étudiés ne fermentent pas l'urée.

7° Cultivés sur G.C.T., les diphtéroïdes présentent 5 types de colonies extrêmement différents les uns des autres. Il n'y a pas de relation entre l'aspect macroscopique et l'origine des souches ou leur pouvoir fermentaire.

8° Sur le milieu G.C.T., les 5 types de diphtéroïdes peuvent être microscopiquement distingués des 3 types du bacille de Loeffler. L'examen microscopique, quoique généralement inutile, pourra fournir, parfois, des indications pour le diagnostic différentiel entre *C. diphteria* var. *mitis* et les diphtéroïdes du type H.

9° Si l'on tient compte des divers caractères biochimiques et morphologiques étudiés, on constate que le genre *Corynebacterium* [2] peut être divisé en un nombre considérable d'espèces distinctes [45], bien plus élevé que celui retenu par Bergey [5], par exemple. Le groupe *C. Hofmanni*, entre autres, nous paraît comprendre plus de deux variétés [55, 56].

#### D. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

1° Le milieu G.C.T., décrit dans ce travail, permet non seulement de reconnaître les trois types de *C. diphteria*, mais encore de distinguer ceux-ci des colonies de diphtéroïdes. Dans les rares cas où il est difficile de distinguer un bacille diphtérique *mitis* d'un diphtéroïde du type « H » par le seul examen macroscopique, la morphologie microscopique apporte les précisions nécessaires.

2° Le milieu G.C.T. est fortement inhibiteur pour les bactéries banales du rhino-pharynx.

3° La recherche de la fermentation d'un seul hydrate de carbone ne permet pas de distinguer à coup sûr le bacille de Loeffler des diphtéroïdes ; la substance la plus capable de permettre cette distinction, dans une mesure pratiquement suffisante, est la dextrine qui est attaquée par tous les bacilles diphtériques mais très rarement par les diphtéroïdes.

4° La recherche de la fermentation de l'urée ne permet pas à

elle seule de différencier le bacille de Loeffler des autres corynébactéries.

5° La valeur différentielle de la culture en gélose profonde, glucosée ou saccharosée, n'est pas absolue ; certains diphtéroïdes se comportent, en effet, dans ces conditions, exactement comme le bacille de Loeffler.

6° Parmi les diphtéroïdes d'origine humaine, on peut distinguer une multitude de souches distinctes ayant des propriétés morphologiques et biochimiques différentes et stables.

#### BIBLIOGRAPHIE

N.-B. — Les références relatives aux ouvrages antérieurs à 1923 ne sont pas reprises ci-dessous ; on les trouvera dans l'excellente monographie du *British Medical Council* [2].

- [1] ANDERSON (J. S.), HAPFOLD (F. C.), MCLEOD (J. W.) et THOMSON (J. G.). *J. Pathol. a. Bacter.*, 1931, **34**, 667.
- [2] ANDREWES (F. W.), BULLOCH (W.), DOUGLAS (S. R.), DREYER (G.), GARDNER (A. D.), FILDES (P.), LEDINGHAM (J. C. G.) et WOLF (C. C. L.). *Diphtheria, its Bacteriology Pathology and Immunology* ; *Med. Res. Counc. Spec. Rep.* ; H. M. Stationery Office, London, 1923.
- [3] BARRATT (M. M.). *J. Hyg.*, 1924, **23**, 241.
- [4] BARRATT (M. M.). *J. Path. a. Bact.*, 1933, **36**, 369.
- [5] BERGEY (D. H.). *Manual of déterminative Bacteriology*. William and Wilkins Co., Baltimore, 4<sup>e</sup> éd., 1939.
- [6] CARTER (H. S.). *J. Hyg.*, 1936, **36**, 147.
- [7] CLAUBERG (K. W.). *Zentralbl. Bakt.*, 1929, **114**, 1, 539.
- [8] CLAUBERG (K. W.). *Zentralbl. Bakt.*, 1931, **120**, 1, 324.
- [9] CLAUBERG (K. W.). *Zentralbl. Bakt.*, 1933, **128**, 1, 153.
- [10] CLAUBERG (K. W.). *Münch. med. Wochenschr.*, 1935, **82**, 944.
- [11] CLAUBERG (K. W.). *Zentralbl. Bakt.*, 1935, **134**, 1, 271.
- [12] CLAUBERG (K. W.). *Zentralbl. Bakt.*, 1936, **135**, 1, 539.
- [13] CLAUBERG (K. W.), HELMREICH (W.) et VIERTHALER (R. W.). *Klin. Wochenschr.*, 1936, **15**, 231.
- [14] EMMERSON. *Sth. African med. J.*, 1937, **11**, 652.
- [15] FROBISHER (M. Jr). *Am. J. Hyg.*, 1938, **23**, 13.
- [16] GLASS (V.). *J. Path. a. Bact.*, 1937, **44**, 235.
- [17] GUNDEL (M.) et TIETZ (C. J.). *Zeitschr., Hyg.*, 1934, **116**, 439.
- [18] HAMMERSCHMIDT (J.). *Zentralbl. Bakt.*, 1924, **93**, 1, 443 ; *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1924, **50**, 1831.
- [19] HILL (J. H.) et WHITE (E. C.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 6.
- [20] HORGAN (S.) et MARSHALL (A.). *J. Hyg.*, 1932, **32**, 544.
- [21] HOYLE (L.). *Lancet*, 1941, **240**, 175.
- [22] JENSEN (L. B.) et FALK (I. S.). *J. Bact.*, 1928, **15**, 367.
- [23] JOHNSTONE (K. I.) et ZINNEMANN (K.). *J. Path. a. Bact.*, 1943, **55**, 53.



- [24] KLEINSORGEN (W.) et COMMICHAU (F.). *Zentralbl. Bakt.*, 1937, **139**, 1, 57.
- [25] MCGUIGAN (M. K.) et FROBISHER (M. JR.). *J. Infect. Dis.*, 1936, **59**, 22.
- [26] MCLEOD (J. W.). *Bacter. Rev.*, 1943, **7**, 1.
- [27] MAIR (W. J.). *J. Path. a. Bact.*, 1936, **42**, 635.
- [28] MELNOTTE (P.). *Rev. Hyg.*, 1938, **60**, 625.
- [29] MÜLLER (J. H.). *J. Immunol.*, 1941, **42**, 343, 353.
- [30] MUNDEL (O.). *Zentralbl. Bakt.*, 1935, **135**, 1, 262.
- [31] NEILL (G. A. W.). *J. Hyg.*, 1937, **37**, 552.
- [32] NOBLE (W. C. JR.) et KNACKE (F. E. D.). *J. Bact.*, 1928, **15**, 55.
- [33] OKELL (C. C.) et BAXTER (E. M.). *J. Path. a. Bact.*, 1924, **27**, 439.
- [34] O'MEARA (R. A. Q.). *J. Path. a. Bact.*, 1940, **51**, 317.
- [35] PARISH (H. J.). *Brit. J. exp. Path.*, 1927, **8**, 162.
- [36] PARISH (H. J.). *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1936, **29**, 481.
- [37] PARISH (H. J.), WHATLEY (E. E.) et O'BRIEN (R. A.). *Brit. med. J.*, 1932, (2), 915.
- [38] PARISH (H. J.), WATHLEY (E. E.) et O'BRIEN (R. A.). *J. Path. a. Bact.*, 1932, **35**, 653.
- [39] PESCH (K. L.) et KRAMER (E.). *Zentralbl. Bakt.*, 1930, **116**, 1, 518 ; *Klin. Woch.*, 1939, **9**, 119.
- [40] PETRIE (J. F.) et McLEAN (D.). *J. Path. a. Bact.*, 1934, **39**, 635.
- [41] PUSCHEL (J.). *Zentralbl. Bakt.*, 1936, **138**, 1, 67.
- [42] STEIGLER (A.). *Zentralbl. Bakt.*, 1936, **138**, 1, 424.
- [43] STUART. *J. Path. a. Bact.*, 1938, **46**, 173.
- [44] SUTHERLAND (P. L.) et IREDALE (J. L. G.). *J. Path. a. Bact.*, 1937, **45**, 325.
- [44 bis] THIBAUT (J.) et WELSCH (M.). *Soc. belge Biol.*, 26 janvier 1946 (sous presse), in *C. R. Soc. Biol.*
- [45] THOMSON (D.) et THOMSON (R.). *Ann. Pickett-Thomson Labor.*, 1926, **2**, 51.
- [46] TIETZ (C. I.). *Deutsch. med. Wochenschr.*, 1935, **61**, 834.
- [47] TULLOCH. Cité d'après [23].
- [48] WELSCH (M.). *Bull. intern. S. S. des Armées*, 1945, **18**, 131.
- [49] WELSCH (M.), DEMELENNE-JAMINON (G.) et HERMANNE (J.). *Rev. belge Sci. Méd.*, 1943, **15**, 1.
- [50] WELSCH (M.), DEMELENNE-JAMINON (G.) et THIBAUT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 326.
- [50 bis] WELSCH (M.), DEMELENNE-JAMINON (G.) et THIBAUT (J.). *Rev. belge Sci. Méd.* (sous presse).
- [51] WELSCH (M.) et JAMINON (G.). *Liège-Méd.*, 1937 (31-32), 1.
- [52] WELSCH (M.) et THIBAUT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 319.
- [53] WELSCH (M.) et THIBAUT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **132**, 323.
- [53 bis] WELSCH (M.) et THIBAUT (J.). *Soc. belge Biol.*, 27 octobre 1945 (sous presse), in *C. R. Soc. Biol.*
- [54] WHITLEY (O. R.). *J. Labor, clin. med.*, 1934, **49**, 943 ; **20**, 1024.
- [55] WOLFF (H. H. de), *Pharm. Weekbl.*, 1927, **1226**, 1263.
- [56] WOLFF (H. H. de), *Nederl. tijd. Hyg. Mikrobiol.*, 1928, **3**, 39, 200.
- [57] WRIGHT (H. A.) et CHRISTISON (M. R.). *J. Path. a. Bact.*, 1935, **41**, 447.

## EXPLICATION DES FIGURES DE LA PLANCHE

Colonies de diverses Corynébactéries après quarante-huit heures d'incubation à 37° sur milieu G. C. T.

Epimicroscope Zeiss; fond noir.

- FIG. 1. — *C. diphtheriæ gravis*.
- FIG. 2. — *C. diphtheriæ intermedius*.
- FIG. 3. — *C. diphtheriæ mitis*.
- FIG. 4. — Diphtéroïde type H.
- FIG. 5. — Diphtéroïde type V.
- FIG. 6. — Diphtéroïde type X.
- FIG. 7. — Diphtéroïde type Y.
- FIG. 8. — Diphtéroïde type Z.





FIG. 1.

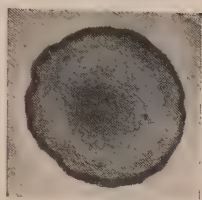


FIG. 2.

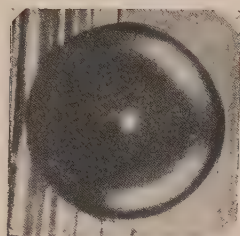


FIG. 3.

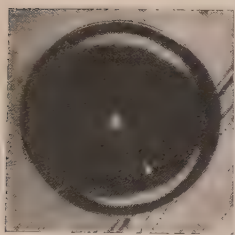


FIG. 4.

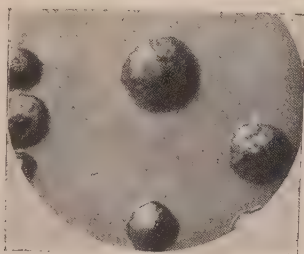


FIG. 5.

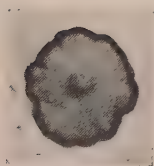


FIG. 6.

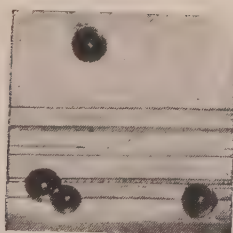


FIG. 7.

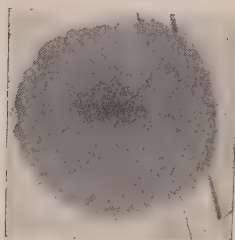


FIG. 8.

Photo. A. Rulemont.

PLANCHE I.

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS





## SPECTRE D'ABSORPTION DES MICROBES DANS L'ULTRAVIOLET

par R. O. PRUDHOMME, M. ROUYER et M<sup>lle</sup> A. M. STAUB (\*).

### Introduction.

La mesure de l'absorption (U.V.) fournit parfois des renseignements précieux sur la structure chimique des corps et sur la composition de mélanges complexes. On peut notamment espérer que l'étude des spectres d'absorption U.V. des microbes puisse donner des indications d'une part sur leur composition chimique, d'autre part sur le mécanisme de l'action stérilisante des rayons U.V., action qui est en rapport étroit avec l'absorption de ces rayons par les germes.

Malgré son intérêt, l'absorption U.V. des microbes a été peu étudiée, par suite des difficultés expérimentales qu'elle rencontre. A cet égard, il convient de préciser les points suivants :

Les micro-organismes sont des mélanges complexes de différents corps qui interviennent avec des importances diverses dans l'absorption totale.

Il est à prévoir que les différentes espèces microbiennes (sauf peut-être les germes possédant un pigment) donnent des spectres très voisins puisqu'il semble que leurs constituants et les proportions relatives de ces constituants varient peu d'une espèce à l'autre.

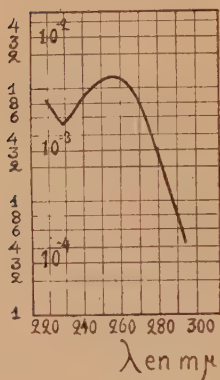
Comme l'absorption U.V. est moléculaire, si la mort résulte d'une « désorganisation » sans modification importante des molécules, on ne doit pas trouver de différence notable entre le spectre d'absorption des germes morts et celui des germes vivants.

L'action stérilisante (1) des rayons U.V., contrairement à celle des rayons X, est fonction étroite de certaines absorptions sélectives. Cette action est elle-même hautement élective. Les radiations de longueur d'onde supérieures à 3.100 Å environ sont inef-

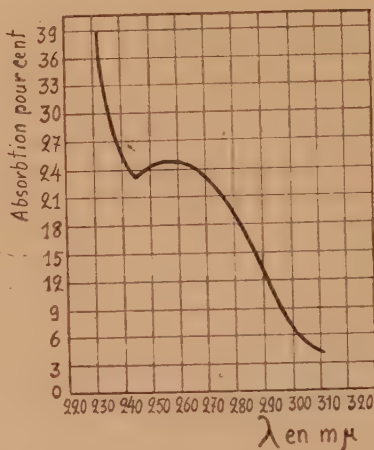
(\*) Séance du 6 juillet 1944 de l'Association des Microbiologistes de Langue française.

(1) Nous avons choisi le terme d'action stérilisante de l'U.V. plutôt que ceux d'action léthale, action microbicide, car le premier effet de l'U.V. est d'arrêter la multiplication des germes sans entraîner la mort. Ce n'est que pour des doses plus élevées qu'il y a arrêt des fonctions diastasiques, etc. Voir LATARJET [7].

ficaces à moins d'utiliser des énergies considérables de rayonnement (2). La courbe spectrale d'efficacité tracée par Gates [4], représente cette variation. La courbe 1 de la figure 1 nous montre qu'elle monte rapidement pour atteindre son maximum aux environs de  $2.600 \text{ \AA}$ , descend vers un minimum situé vers  $2.400 \text{ \AA}$  et remonte ensuite jusqu'à  $2.200 \text{ \AA}$ . En dessous de cette longueur d'onde l'expérimentation devient très difficile, mais il est certain



COURBE 1.



COURBE 2.

FIG. 1.

COURBE 1. — Courbe d'efficacité spectrale de bacille du côlon (d'après Gates).

COURBE 2. — Spectre d'absorption d'un film de bacille du côlon (épaisseur environ  $5 \mu$ ) [d'après Gates].

que la courbe continue son ascension (Rouyer et Servigne [11] ont mis en évidence l'action stérilisante de la raie  $1.862 \text{ \AA}$  de l'aluminium).

Cette courbe reflète l'absorption des rayons U. V. par la zone cellulaire sensible. Elle est très voisine de la courbe d'absorption du microbe comme le montre la courbe II de la figure 1 (tracée par Gates, par un procédé que nous verrons plus loin).

Nous examinerons d'abord les différentes méthodes qui s'offrent à nous pour obtenir le spectre d'absorption des microbes et les travaux déjà faits dans cette voie. Avec une méthode simple,

(2) Dans des expériences récentes et non publiées, PRUDHOMME et ROUYER sont arrivés à stériliser des germes avec des radiations allant jusqu'à  $4.100 \text{ \AA}$ .



nous étudierons les spectres de différentes espèces microbiennes et de quelques lysats microbiens. Nous vérifierons pour une espèce, que morts ou vivants les germes présentent le même spectre d'absorption. Enfin nous chercherons à tirer de l'étude des spectres d'absorption microbiens, des renseignements intéressant la radiobiologie.

### 1° SPECTRE D'ABSORPTION D'UNE ÉMULSION MICROBIENNE.

La lumière qui a traversé une émulsion microbienne, même très diluée ne peut guère donner de renseignements sur le spectre

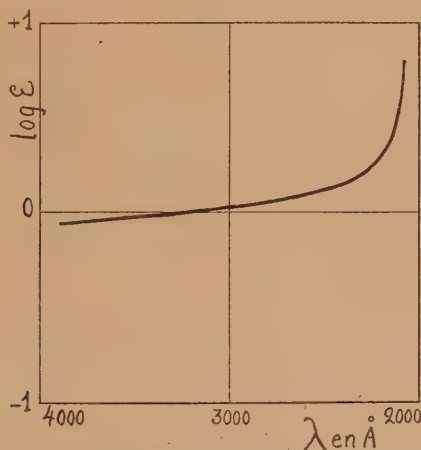


FIG. 2. — Spectre d'absorption d'une émulsion de B. C. G.  
( $10^8$  bacilles au centimètre cube).

d'absorption de celle-ci, car l'absorption est pour ainsi dire noyée dans la perte de lumière par diffusion, perte d'autant plus grande que la longueur d'onde est plus courte.

Cependant plusieurs auteurs [1, 2] ont employé ce procédé et ont simplement constaté la coïncidence spectrale des radiations stérilisantes et des radiations absorbées.

En employant la méthode spectrophotométrique déjà décrite [9], nous avons essayé d'obtenir le spectre d'absorption d'une émulsion de bacilles du côlon contenant  $10^8$  germes au centimètre cube. Les résultats sont donnés par la courbe de la figure 2. Dans son ensemble la courbe présente l'aspect fourni par une émulsion de nature quelconque. On ne peut mettre en évidence ni maximum, ni minimum d'absorption. Cela n'a rien d'étonnant si l'on songe à l'intensité de la diffusion par une telle suspension.

## 2° SPECTRE D'ABSORPTION DE FILMS MICROBIENS.

Beaucoup plus élégante est la technique employée par Gates [4], en 1930. Elle consiste à écraser les germes étudiés entre deux disques plans en quartz, jusqu'à l'épaisseur d'un film incolore et transparent comparé sur un spectrophotomètre, à un témoin constitué par deux disques identiques aux premiers, accolés par de l'eau ou de la glycérine. La diffusion étant ainsi éliminée en majeure partie, il reste à déterminer l'épaisseur microbienne traversée. C'est là que réside la difficulté de cette méthode ; Gates procède par interférométrie sur la lame d'air comprise entre les deux disques enserrant le film microbien (spectre cannelé). L'ordre de grandeur de ces épaisseurs est de 5 à 10  $\mu$ . Cette mesure est entachée de 2 sortes d'erreurs : sur le pointage des cannelures et sur la mesure de l'angle d'indidence. De plus cette épaisseur n'est pas constante sur toute l'étendue du film traversée par la lumière. Elle varie d'un bord à l'autre d'une quantité qui n'est pas négligeable par rapport à cette épaisseur. Ajoutons qu'il est difficile de connaître le nombre de bacilles mis en jeu dans cette absorption.

L'auteur donne pour le staphylocoque doré et le bacille du côlon des courbes d'absorption qui se superposent en grande partie aux courbes spectrales d'efficacité qu'il avait déterminées auparavant pour ces deux germes (voir figure I, courbe II, la courbe d'absorption d'un film de bacilles du côlon). L'examen des courbes d'absorption montre un maximum très net voisin de 2.600 Å et un minimum vers 2.450 Å. Le maximum d'absorption coïncide avec le maximum de la courbe spectrale d'efficacité ; le minimum s'en écarte légèrement, celui de la courbe spectrale de stérilisation étant rejeté vers les petites longueurs d'onde, nettement en dessous de 2.400 Å. L'auteur explique ces différences par l'existence de substances absorbantes dans l'ultraviolet et qui ne rentreraient pas en jeu dans le mécanisme de l'action stérilisante.

Nous avons répété les expériences de Gates pour le staphylocoque doré et le bacille paratyphérique Y6R par une technique identique : prélèvement des corps bactériens d'une culture sur gélose, écrasement entre deux disques de quartz, mesure de l'épaisseur (environ 6  $\mu$ ) par interférométrie.

Nous avons utilisé le spectrographe à optique de quartz pour chimiste de Zeiss, avec dispositif photométrique à secteur tournant. Comme source : soit l'étincelle condensée entre les électrodes de tungstène, soit, le plus souvent, un tube à hydrogène (système Challenge). Les clichés obtenus présentent une bande d'absorption peu marquée dans la région de 2.600 Å. L'étude de cette



bande au microphotomètre enregistreur de Sannié a précisé le maximum à  $2.595 \text{ \AA}$ , le minimum à  $2.450 \text{ \AA}$ . La courbe d'absorption de ce film microbien est représentée dans la figure 3. Nous avons pris comme ordonnées le logarithme du coefficient d'extinction, calculé sans tenir compte de la concentration, c'est-à-dire ici, du nombre de germes. La courbe est la même pour les 2 germes étudiés. Plusieurs séries de mesures nous ont donné des résultats identiques.

Nos résultats reproduisent à peu de chose près ceux de Gates. Seule diffère sensiblement la position du minimum ( $2.380 \text{ \AA}$  contre

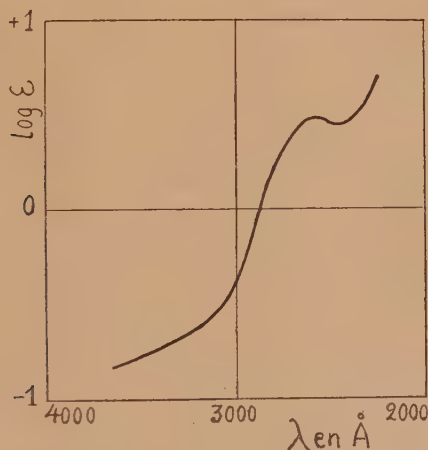


FIG. 3. — Spectre d'absorption d'un film microbien de bacille para-dysentérique Y. 6 R. (épaisseur environ  $6 \mu$ .)

$2.450$ ), l'utilisation du microphotomètre rendant notre pointé plus exact. Mais les critiques déjà faites s'appliquent ici, et pour les éviter, nous avons imaginé la méthode suivante.

### 3° SPECTRE D'ABSORPTION DES MICROBES ULTRA-SONNÉS.

L'ultra-sonnation d'une émulsion microbienne fragmente, par un phénomène encore mal expliqué (probablement cavitation) les germes dont les constituants passent alors dans la phase dispersive. L'un de nous [10] a montré qu'en utilisant des ondes ultra-sonores de longueurs d'onde appropriées et des énergies relativement grandes on pouvait détruire ainsi un pourcentage élevé de germes.

En ultra-sonnant une émulsion riche en germes et en centrifugeant ensuite on obtient un liquide surnageant opalescent qui con-

tient en solution (vraie ou colloïdale ou les deux) les constituants solubles des bacilles détruits. Avec ce liquide, on pourra opérer comme avec une solution ordinaire, c'est-à-dire employer la méthode spectrophotométrique classique où les épaisseurs et les concentrations sont bien déterminées.

Les coefficients d'absorption sont peu entachés d'erreurs (sauf celles sur la concentration provenant de la numération des microbes, erreurs relativement faibles par rapport au nombre de corps microbiens mis en jeu), et pourront être ramenés à un nombre connu de germes. De plus, les microbes étant bien lavés avant l'ultra-sonnation, on n'a pas à craindre, comme dans la méthode de Gates, l'apport de substances étrangères provenant du milieu de culture et pouvant fausser l'absorption.

Nous avons mis en œuvre cette technique pour avoir les spectres d'absorption de microbes très différents : bacille du côlon (coli 36), bacille typhique (0.901), bacille dysentérique (Shiga 30), bacille mégathérium (souche asporogène, mutilat), staphylocoque doré (S 3 K) et B. C. G.. Sauf pour le B. C. G. qui était récolté à partir d'une culture sur pomme de terre âgée de quinze jours, les autres microbes provenaient de cultures âgées de dix-huit heures sur gélose. Les émulsions microbiennes préparées soit dans l'eau physiologique, soit dans le liquide de Ringer, soit dans une solution de phosphates tampon à pH 7.2, contenaient, suivant les cas, de plusieurs centaines de millions à quelques milliards de germes au centimètre cube (détermination faite par ensemencements de dilutions convenables sur boîtes de gélose et numération des colonies, sauf pour le B. C. G. dont on a fait une numération directe). Une numération faite après ultra-sonnation donnait le pourcentage des germes détruits. Il variait suivant les expériences de 75 à 99 p. 100. On est donc en possession d'une solution qui contient par centimètre cube la substance d'un certain nombre connu de microbes. Pour pouvoir faire des mesures comparables, nous avons choisi comme concentration unité celle qui correspond à la substance de  $10^8$  microbes par centimètre cube. Dans le calcul des coefficients d'absorption :

$$\left( \epsilon = \frac{1}{c} \cdot \frac{1}{d} \cdot \log \frac{I_0}{I} \right)$$

les diverses concentrations ont été ramenées à cette valeur.

Voici à titre d'exemple la marche d'une expérience :

*Bacille dysentérique Shiga 30.* — On prélève le contenu de 3 boîtes de Roux de culture sur gélose de bacilles dysentériques Shiga 30, âgées de dix-huit heures. Après trois lavages à l'eau physiologique les bacilles sont mis en suspension dans 10 c. c. d'une solution de phosphates tampon à pH 7.2.

Cette émulsion est ultra-sonnée pendant quarante-cinq minutes avec

l'appareil et suivant la technique déjà décrite par l'un de nous [10]. La fréquence utilisée est de 920 kilocycles. La température n'a pas dépassé 15° pendant l'opération.

Le produit est placé aussitôt après à la température de 0° pour ralentir les actions diastasiques possibles, puis il est centrifugé rapidement pour éliminer les bacilles non détruits et les débris microbiens. Le liquide surnageant, opalescent est prélevé et on en détermine immédiatement l'absorption.

La numération des germes, pratiquée par ensemencement de dilutions convenables sur boîtes de gélose et dénombrement des colonies, donne  $21,3 \cdot 10^9$  bacilles au centimètre cube avant ultra-sonnation et  $1,9 \cdot 10^9$  bacilles au centimètre cube après ultra-sonnation, soit  $19,4 \cdot 10^9$  bacilles détruits au centimètre cube (91,4 p. 100). La solution dont on étudie l'absorption contient donc par centimètre cube la substance soluble de  $19,4 \cdot 10^9$  bacilles dysentériques, soit, si l'on prend comme concentration unité  $1 \cdot 10^8$ , une concentration égale à 194. Pour effectuer les mesures d'absorption nous nous sommes servis du grand spectrographe à optique de quartz pour chimiste de Zeiss, muni d'un prisme de Hüfner, en utilisant la technique que nous employons couramment [9]. Le liquide étant dilué dix fois ou même cent fois pour en faire le spectre, l'opalescence est pratiquement inexistante et la diffusion presque nulle.

Les clichés obtenus présentent une bande d'absorption très nette avec un maximum vers 2.600 Å et un minimum vers 2.400 Å.

L'enregistrement de cette bande au microphotomètre de Sannié nous fixe les positions suivantes : maximum 2.580 Å, minimum 2.410 Å. Cette courbe est représentée dans la figure 4.

Les courbes obtenues pour les différents germes que nous avons étudiés sont toutes semblables comme l'on pouvait s'y attendre : maximum compris entre 2.560 Å et 2.580 Å, minimum entre 2.400 Å et 2.420 Å. Les faibles écarts des positions de ces deux points sont de l'ordre de grandeur des erreurs d'expériences. Les courbes obtenues sont encore semblables aux courbes spectrales d'efficacité de Gates. Les coefficients d'absorption au maximum diffèrent suivant les germes comme le montre la figure IV. Ils varient pour une solution contenant la substance d'une émulsion d'environ  $10^8$  germes au centimètre cube entre  $\log \epsilon = -1,2$  et  $\log \epsilon = 0,6$ , soit une absorption variant de 1 (typhique) à 100 (megatherium).

D'où proviennent ces écarts ?

Ils peuvent venir d'une erreur sur la numération des germes. Cependant, en admettant une erreur de 20 p. 100 dans la numération, le calcul montre que les écarts trouvés pour  $\log \epsilon$  sont inférieurs à ceux que l'expérience donne.

On peut formuler à leur sujet 4 hypothèses :

1° L'ultra-sonnation des diverses espèces bactériennes ne libère pas la totalité des constituants microbiens, et la fraction éliminée par la centrifugation varie suivant les espèces.



2° Tous les germes ne contiennent pas la même quantité de matière sèche. Quand on prend 2 émulsions de même titre, préparées à partir de microbes différents, elles ne contiennent pas toutes deux, la même quantité de matière absorbante d'où une différence dans l'intensité de l'absorption.

3° Quand on fait par ensemencement la numération des microbes

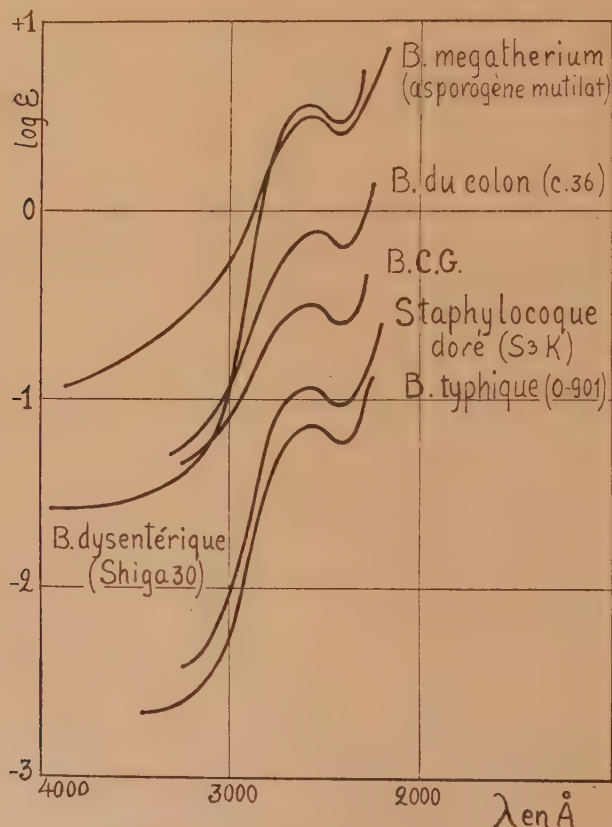


FIG. 4. — Spectre d'absorption de microbes ultra-sonnés.

contenus dans une émulsion, on ne compte que les germes vivants. Cette émulsion peut contenir plus ou moins de microbes morts, qui libèrent à l'ultra-sonnation leurs constituants. Ceux-ci viennent s'ajouter à la matière des germes vivants. Le liquide obtenu correspond alors à la substance d'un plus grand nombre de germes que l'on avait compté.

4° Ces différences d'intensité d'absorption correspondent vérita-

blement à une différence d'absorption des constituants des diverses espèces.

D'autres expériences faites avec des précautions spéciales, (poids sec des émulsions, numération des germes par ensemencement et par comptage direct) nous permettront peut-être de résoudre cette question.

En résumé, cette technique plus maniable que celle de Gates, permet non seulement d'obtenir facilement le maximum et le minimum, mais encore approximativement le coefficient d'absorption des constituants solubles des micro-organismes.

#### 4° SPECTRE D'ABSORPTION DES EXTRAITS MICROBIENS OBTENUS PAR CONGÉLATION.

La destruction des corps microbiens par congélation et reheaufement brusque répétés est un procédé particulièrement simple auquel nous avons pensé, pour obtenir la substance des germes. Cette opération déjà décrite par l'un de nous [12], a été pratiquée sur le bacille du charbon (souche avirulente  $\gamma 7$ ) :

On centrifuge les bacilles de 50 boîtes de Roux (en bouillon) laissées quarante-huit heures à l'étuve à 37°. Le culot est congelé à 40°, puis reheuffé au bain-marie à 40°. Cette opération est répétée 4 fois de suite. Le culot est finalement repris dans 30 c. c. d'eau distillée et centrifugé en évitant l'échauffement pendant la centrifugation. Le liquide obtenu est opalescent comme celui résultant de l'ultra-sonnation. On en fait le spectre d'absorption par la méthode classique, sans tenir compte de la concentration puisqu'ici nous n'avons aucune idée de la quantité de germes à laquelle correspond l'extrait.

Les clichés montrent une bande d'absorption moins nette qu'avec les germes ultra-sonnés et cependant beaucoup plus visible qu'avec les germes intacts. L'enregistrement fixe le maximum d'absorption à 2.540 Å.-2.550 Å et le minimum à 2.380 Å. La courbe présente encore la même allure que celles trouvées sur ces germes intacts ou ultra-sonnés.

On remarque une légère différence entre le maximum obtenu à partir des microbes ultra-sonnés et celui des extraits microbiens. Cela n'a rien d'étonnant, car il est possible que l'extraction par congélation ne nous fournisse pas exactement les mêmes constituants microbiens.

Il est intéressant de savoir si la précipitation de cet extrait microbien à pH 4, précipitation utilisée pour l'obtention de nucléoprotéïdes immunologiquement actifs [12], modifie la courbe d'absorption. Dans ce but, nous avons amené au pH voulu, par addition d'acide acétique un extrait microbien de bacille du charbon ( $\gamma 7$ ) préparé par la méthode précédente. Après centrifugation, le préci-

pité qui possède les propriétés antigéniques est redissous dans un peu de soude jusqu'à neutralité. Le liquide surnageant est aussi neutralisé. On mesure l'absorption des deux liquides ainsi que celle de l'extrait initial. Dans tous les essais que nous avons faits le liquide surnageant présente une bande très nette dont le maximum et le minimum sont décalés vers les petites longueurs d'onde (maximum : 2.505 Å ; minimum : 2.330 Å) par rapport à l'extrait total, alors que le précipité donne une bande moins nette décalée vers les grandes longueurs d'onde (maximum : 2.580 Å ; minimum : 2.440 Å).

##### 5° SPECTRE D'ABSORPTION DE DIFFÉRENTS LYSATS MICROBIENS.

a) *Autolysats*. — Comme nous devions nous y attendre, l'autolyse libre dans le milieu environnant la substance des germes en suspension dans ce milieu.

Une émulsion de bacilles dysentériques (Shiga 30) dans l'eau physiologique est abandonnée à la température ordinaire pendant six heures. Après centrifugation on fait la mesure de l'absorption du liquide surnageant. La faible quantité de substance présente dans le liquide, fait que le cliché montre une bande d'absorption peu nette, dont l'enregistrement nous fixe des longueurs d'onde identiques à celles du même bacille ultra-sonné. Cependant, cette quantité est suffisante pour que le liquide possède des propriétés toxiques relativement élevées puisqu'il tue la souris au 1/100 de centimètre cube en trois jours.

b) *Lysat par la soude*. — D'autres méthodes plus brutales permettent de détruire les corps microbiens, tout en leur conservant un certain pouvoir antigénique. C'est le cas du lysat à la soude de Mauté obtenu à partir du bacille du côlon. Il était intéressant de voir si cette destruction s'accompagnait d'un changement dans l'absorption. *A priori*, il doit y avoir scission des nucléo-protéides et dénaturation des protéides. Mais cette lyse des groupements moléculaires de la matière vivante, doit conserver la personnalité des molécules élémentaires constitutives et le spectre d'absorption doit se trouver inchangé. Cela tient à ce que les substances présentes sont surtout constituées par des molécules ne changeant pas de structure quand on les traite par la soude. C'est ce que l'expérience a montré :

10 mg. de bacilles du côlon humides sont émulsionnés dans 10 c. c. de lessive de soude au 1/10 (soude environ normale). Après quinze heures de séjour à 37°, on centrifuge et l'on fait le spectre d'absorption du liquide surnageant. La courbe obtenue montre comme pour les autres cas un maximum d'absorption aux environs de 2.600 Å et un minimum vers 2.400 Å.



6° SPECTRE DE MICROBES TUÉS PAR LA CHALEUR  
OU LES RAYONS ULTRA-VIOLETS.

Nous avons voulu vérifier, comme il est à prévoir et comme nous le rappelions au début, que la mort des microbes n'est pas liée à des modifications chimiques profondes des molécules élémentaires les constituant, c'est-à-dire, qu'elle n'entraîne pas une modification du spectre d'absorption. Pour cela, nous avons soumis à l'ultra-sonnation une émulsion de *B. paradysentériques* tués soit par la chaleur (20 minutes à 120°), soit par irradiation ultra-violette (émulsion placée à 20 cm. d'une lampe Philora H. P. 500 pendant trente minutes). Le spectre d'absorption du liquide centrifugé donne après enregistrement les mêmes longueurs d'onde pour le maximum et pour le minimum que celles de la même émulsion vivante ultra-sonnée.

Dans d'autres expériences, nous avons opéré non pas sur les microbes eux-mêmes, mais sur les constituants obtenus par ultra-sonnation :

Une émulsion des bacilles paradysentériques (Shiga 30) est ultra-sonnée suivant la technique précédente. Après centrifugation le liquide est divisé en trois parties. Sur la première nous mesurons directement l'absorption. La seconde est irradiée dans un tube de quartz pendant trente minutes à 20 cm. d'une lampe Philora (H. P. 500) à une dilution telle qu'elle soit transparente aux U. V. La troisième partie est chauffée en tube scellé pendant vingt minutes à 120°. Après cette opération, le liquide montre un coagulum que l'on élimine par centrifugation. On fait les spectres d'absorption du liquide initial, du liquide irradié et du liquide surnageant de la troisième portion. Les courbes obtenues montrent toutes les trois le même maximum. Le minimum des deux premières portions sont identiques. Quant au liquide surnageant obtenu après coagulation par la chaleur, son maximum est identique aux deux autres, mais son minimum est décalé vers les courtes longueurs d'onde (2.355 Å au lieu de 2.400 Å) ; ceci n'a rien d'étonnant puisqu'une partie des constituants microbiens s'est séparée par coagulation.

En résumé, comme on pouvait le penser, la matière morte ou vivante montre le même spectre d'absorption, puisque ses constituants sont les mêmes dans les deux cas. La mort d'une cellule vivante doit être liée à des facteurs physico-chimiques qui échappent à l'investigation par les spectres d'absorption en ultra-violet.

### Discussion.

Toutes les méthodes que nous avons examinées, sauf une (la première), donnent des résultats semblables : les micro-organismes

présentent dans l'ultra-violet un maximum d'absorption situé aux environs de  $2.600 \text{ \AA}$  et un minimum d'absorption vers  $2.400 \text{ \AA}$ . Mais seule la spectrographie des germes ultra-sonnés permet de déterminer facilement le coefficient d'absorption des constituants microbiens. Au maximum d'absorption la substance de  $10^8$  germes possède un coefficient d'absorption dont le logarithme est compris entre 1,2 et 0,6 suivant les germes que nous avons étudiés. Il reste à vérifier si ces écarts dans le log. sont dus à ce que les constituants des différentes espèces microbiennes ne possèdent pas le même coefficient d'absorption ou ce qui est plus probable à une différence de concentration en molécules absorbantes. De plus, il serait intéressant de voir si le coefficient d'absorption varie avec l'âge et les conditions de culture.

Au point de vue radiobiologique, que peut-on tirer de cette étude ? L'identité d'allure des courbes spectrales d'efficacité de Gates et des courbes d'absorption ne saurait être mise en doute. Doit-on en conclure que l'ensemble des constituants du microbe rentre en jeu dans le mécanisme de l'action des radiations ? Les recherches de ces dernières années (notamment sur l'action léthale des rayons X) rendent cette hypothèse très peu probable (Holweck et Lacassagne [5], Latarjet [8]). L'existence de la zone sensible peut être difficilement mise en doute.

Il est plus vraisemblable d'admettre que, dans la cellule vivante il existe un certain nombre d'édifices moléculaires qui présentent des courbes d'absorption voisines dont la combinaison donne la courbe d'absorption du micro-organisme entier. De plus, si l'absorption totale est due pratiquement à une très petite fraction de la cellule, beaucoup plus absorbante que tout le reste, les phénomènes se dérouleront comme ceux qui ont été observés. Cette petite fraction pourrait coïncider approximativement avec la zone sensible.

En radiobiologie, la connaissance de l'énergie absorbée par la zone sensible est d'un grand intérêt. Elle permet le calcul du nombre de photons nécessaires pour produire une lésion déterminée. Pour cela, il faut connaître la courbe d'absorption de la zone sensible. Malheureusement nous ne possédons pas cette courbe. Les courbes d'absorption que nous avons obtenues nous donnent pour chaque longueur d'onde le coefficient d'absorption de l'ensemble des constituants microbiens. Elles ne pourront pas nous fixer sur le coefficient d'absorption de la partie du microbe, de l'organite hypothétique, où doivent être absorbés les photons pour provoquer l'action léthale ; autrement dit le coefficient d'absorption, tel que nous pouvons le calculer par le spectre d'absorption du micro-organisme, peut nous fournir pour chaque longueur d'onde, en fonction de l'énergie incidente, le nombre de photons absorbés par l'ensemble du microbe, sans nous préciser à combien de photons absorbés revient l'action stérilisante.

Il est tentant d'assimiler ces groupements sensibles à des combinaisons très absorbantes comme les nucléoprotéides qui se trouvent constamment dans la matière vivante et dont le maximum d'absorption coïncide avec celui du spectre d'absorption des micro-organismes (notamment l'acide nucléique de levure dont le maximum est à 2.600 Å et le minimum à 2.350 Å). D'autres faits sont aussi en faveur de cette hypothèse :

La courbe spectrale d'efficacité des radiations ultra-violettes sur les spermatozoïdes (qui sont presque uniquement composés de nucléoprotéides) est très voisine de la courbe d'absorption des acides nucléiques [6].

La présence de fortes concentrations de nucléotides dans les cellules se divisant rapidement (Capersson [3]).

De nombreuses propriétés vitales telles que la mutation, la virulence, la spécificité, le pouvoir antigénique, la multiplication, sont sous la dépendance de protéides caractérisés par la présence d'acide nucléique.

Mais rien jusqu'ici ne nous permet de le démontrer. Il existe en effet d'autres corps que l'on peut rencontrer dans la matière vivante et dont les constantes d'absorption sont très voisines de celles du microbe entier.

### Conclusions.

1° En employant la méthode de Gates, pour obtenir le spectre d'absorption ultra-violet d'un film microbien, nous avons vérifié sur le bacille du côlon et le bacille paratyphérique Y6 R, les résultats obtenus par cet auteur : la courbe d'absorption est semblable à la courbe spectrale d'efficacité. Elle présente un maximum voisin de 2.600 Å et un minimum vers 2.450 Å.

2° L'ultra-sonnation d'une émulsion microbienne donne un matériel avec lequel on peut facilement avoir non seulement le maximum et le minimum d'absorption, mais encore le coefficient d'absorption de l'ensemble des constituants des micro-organismes.

3° Les spectres d'absorption des différents microbes que nous avons étudiés par la méthode des germes ultra-sonnés, sont tous semblables entre eux : maximum d'absorption entre 2.560 Å et 2.580 Å, minimum entre 2.400 Å et 2.420 Å. Les courbes d'absorption sont aussi très voisines de la courbe spectrale d'efficacité de Gates.

4° Le logarithme du coefficient d'absorption au maximum des constituants microbiens d'une émulsion contenant  $10^8$  germes au centimètre cube est compris entre -1,2 et 0,6 suivant les germes.

5° Les extraits microbiens obtenus par congélation présentent une bande d'absorption ayant son maximum aux environs de 2.550 Å. La précipitation de l'extrait à pH 4 dédouble cette bande :



le précipité présente un maximum vers 2.580 Å, alors que le maximum d'absorption du liquide surnageant est à 2.500 Å environ.

6° L'autolysat ou le lysat par la soude d'une émulsion microbienne libère des substances dont l'absorption est identique à celle que nous avons trouvée pour les constituants microbiens obtenus par ultra-sonnation.

7° Les constituants de microbes tués par la chaleur ou par irradiation ultra-violette présentent le même spectre d'absorption que les constituants des mêmes germes vivants.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAYNES (JONES S.) et VAN DER LINGEN (J. S.), *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1923, **34**, 11.
- [2] BROWNING (G. M.) et RUSS (S.), *Proc. Roy. Soc.*, série B., **90**, 33.
- [3] CASPERSSON (T.), *Nature*, 1939, **143**, 602.
- [4] GATES (F.), *J. Gen. Physiol.*, 1930, **14**, 31.
- [5] HOLWECK (F.) et LACASSAGNE (A.), *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 814 et *Radiophysiol. et Radioth.*, 1934, **3**, 215-235.
- [6] KNAPP (E.), REUSS (A.), RISSE (O.), SCHREIBER (H.), *Naturwiss.*, 1939, **27**, 304.
- [7] LATARJET (R.), *Cahiers de Physique*, 1944, n° 23, 57.
- [8] LATARJET (R.), *ces Annales*, 1943, **69**, 205.
- [9] PRUDHOMME (R.-O.), *ces Annales*, 1941, **67**, 4196.
- [10] GRABAR (P.) et ROUYER (M.), *ces Annales*, 1945, **71**, 154.
- [11] ROUYER (M.) et SERVIGNÉE (M.), *ces Annales*, 1938, **61**, 565.
- [12] STAUB (A.-M.) et GRABAR (P.), *ces Annales*, 1944, **70**, 16.

# CHIMIOTHÉRAPIE ASSOCIÉE A LA DÉSENSIBILISATION EN TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE

## II. — ACTION DU p. AMINO-BENZÈNE SULFONYL THIOURÉE ASSOCIÉE A LA TUBERCULINE

par B. KREIS (\*).

Dans une note précédente nous avons émis l'opinion qu'en s'opposant de façon aussi complète que possible à l'apparition des réactions allergiques chez le cobaye tuberculeux on devait faciliter l'activité des produits chimiothérapiques. Nous avons vérifié cette hypothèse dans le cas d'un groupe de cobayes soumis à une infection tuberculeuse relativement faible (0,001 mg. de culture de bacilles tuberculeux sur Löwenstein, pesés humides). Six animaux recevaient à la fois une injection trihebdomadaire de 0,1 c. c. de tuberculine brute et une injection sous-cutanée bi-quotidienne de 0,04 de paraaminophénylsufamide (septoplax). Deux autres groupes de six animaux étaient soumis seulement aux injections de tuberculine ou de sulfamide ; un dernier groupe de 6 cobayes servait de témoin. L'étude de l'importance et de la répartition des lésions, du poids des organes, de la dispersion bacillaire, des coupes histologiques, nous a montré que dans ces conditions les cobayes traités et désensibilisés présentaient après cent trente-huit à cent cinquante-trois jours une tuberculose nettement moins étendue que les témoins non traités et aussi que les animaux traités par la tuberculine ou le sulfamide seuls.

Pour éprouver la validité de notre hypothèse, il nous a paru intéressant de tenter une expérience analogue en nous plaçant dans des conditions extrêmes : tuberculisation massive ; traitement sulfamidé à doses considérables ; composé sulfamidé différent du précédent. En l'occurrence nous avons utilisé le p-amino-benzène sulfonyl thiourée commercialisé sous le nom de *fontamide*. Pour ce simple essai, en raison du manque d'animaux, nous nous sommes contenté d'un groupe de 4 cobayes traités et d'un groupe de 4 cobayes témoins. Malgré la pauvreté de ce dispositif expérimental les résultats nous paraissent mériter d'être signalés en raison de leur parfaite régularité.

Tous les animaux ont été inoculés le 12 avril 1944, sous la peau de la cuisse gauche avec 1 c. c. d'une émulsion à 10 mg. par centimètre cube, de bacilles tuberculeux cultivés sur milieu de Löwenstein, pesés humides. Nous avons utilisé un mélange de 3 souches différentes de bacilles humains, récemment isolées par nous ; 2 de ces souches isolées de crachats avaient

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 7 juin 1945.

été traitées par l'acide sulfurique ; la troisième provenait d'un ensemencement direct de liquide pleural. Pour assurer une homogénéité plus parfaite de l'émulsion, celle-ci a été laissée treize heures au repos, puis décantée ; le liquide surnageant restait fortement opalescent. L'infection a été réalisée avec la même seringue piquant alternativement un animal traité et un animal témoin. Le traitement sulfamidé a consisté, jusqu'au 1<sup>er</sup> mai, en 2 injections quotidiennes de 5 c. c., d'une dilution au 1/10 de la solution commerciale de solufontamide correspondant à 0,33 g., par jour et par cobaye. A partir du 1<sup>er</sup> mai, et en raison des réactions cutanées, il n'a plus été pratiqué qu'une seule injection quotidienne de 0,16 g. chaque soir ; mais on donnait en plus chaque matin 0,25 g. de poudre de fontamide étalée sur une tranche de betterave ; l'irrégularité de l'absorption a parfois nécessité un complément en injection. Ces doses se sont révélées nettement toxiques ; après la mort du premier de nos cobayes elles ont été ramenées à 0,20 g. *per os* et 0,16 g. par voie sous-cutanée.

Comme dans notre précédente expérience, nous nous sommes opposés chez les animaux traités à l'apparition des réactions allergiques par des injections sous-cutanées trihebdomadaires de 0,1 c. c. de tuberculine brute. Ces injections ont été commencées douze jours avant l'inoculation. Tous les cobayes traités ont présenté des réactions nulles à l'injection intradermique de 1/10 de centimètre cube de tuberculine. Tous les témoins éprouvés aux mêmes dates et dès le quinzième jour ont réagi fortement avec une zone nécrotique d'environ 15 mm. Nous avons cherché à préciser s'il n'existait pas tout de même un certain degré de sensibilité tuberculinique chez nos animaux traités en étudiant la réaction thermique provoquée par l'injection sous-cutanée de tuberculine brute. Certains de nos cobayes ont paru réagir à quelques injections tuberculiniques, mais leur température était déjà par elle-même instable ; un cinquième cobaye inoculé et traité dans les mêmes conditions ne répondait nullement à la dose de 1/10 de centimètre cube, qui provoque une poussée fébrile intense chez des témoins non traités ; il a survécu, sans paraître incommodé, à une injection de 1 c. c., représentant au moins 3 doses mortelles pour les témoins ; toutefois cette épreuve a entraîné une ascension thermique nette :

— 0 heure . . . . .	39
— 3 heures . . . . .	40°3
— 7 heures . . . . .	39°8
— 12 heures . . . . .	40°2
— 24 heures . . . . .	39°4

La désensibilisation de nos animaux n'a donc pas été totale ; elle reste très considérable puisqu'il peut être nécessaire pour la trouver en défaut de recourir à une quantité de tuberculine correspondant à 2 ou 3 doses d'épreuve pour une vache.

Les résultats obtenus ont été les suivants. Tous les cobayes ont très rapidement présenté une grosse réaction ganglionnaire locale qui s'est vite accompagnée d'un énorme abcès caséeux. L'amaigrissement a été rapide, mais beaucoup plus marqué chez les cobayes traités. Alors que tous les témoins ont présenté, pendant toute la durée de l'expérience, un aspect normal, tous les animaux



traités ont bientôt traduit par leur comportement l'importance de l'intoxication à laquelle ils étaient soumis. Tous sont morts entre le trentième et le cinquante-septième jour. Un témoin de même poids a été sacrifié, chaque fois, à jeun, le jour de la mort du cobaye traité. Il est à noter que d'autres animaux inoculés le même jour avec la même dose de la même émulsion en vue d'autres expériences, traités ou non par la tuberculine, ont survécu plus de deux mois et demi. La mort prématurée des animaux traités est donc bien en rapport avec l'absorption sulfamidée.

A l'autopsie tous les animaux, traités ou non, présentaient d'importantes lésions locales et une forte dissémination tuberculeuse. Mais l'étude du volume des ganglions ou de la rate montre cependant une différence notable entre cobayes traités et témoins. Comme dans notre précédente expérience, et pour les mêmes raisons, l'étude du poids des organes nous a paru être le test de comparaison le plus objectif et le plus fidèle. On verra dans le tableau ci-contre que, si l'importance des lésions a été progressivement croissante à mesure que la durée de survie a été plus longue (1), elle est restée cependant régulièrement bien moindre chez les animaux traités, au point que, dans ce groupe, les poids des organes sont presque deux fois plus faibles.

TABLEAU 1. — Action de l'association fontamide-tuberculine sur la tuberculose expérimentale provoquée par une injection massive de bacilles tuberculeux.

NUMÉRO des cobayes	DURÉE de l'expérience jours	POIDS de l'animal au début et à la fin de l'expérience	POIDS de la rate	POIDS des ganglions	POIDS des poumons	POIDS du foie
1857 (témoin) .	30	415-350	2,200	2,650	6,520	20,320
1853 (traité) . .	30	425-385	0,850	1,755	4,900	11,700
1859 (témoin) .	32	385-335	2,300	3,330	7,150	20,200
1854 (traité) . .	32	525-335	1,920	1,500	5,050	12,800
1858 (témoin) .	46	470-400	1,190	3,425	4,050	21,650
1855 (traité) . .	46	355-345	0,600	2,340	5,250	14,250
1856 (témoin) .	57	585-430	6,850	5,920	12,850	34,900
1852 (traité) . .	57	525-325	3,000	3,330	8,250	16,350
<i>Poids totaux.</i>						
1856-1857-1858-1859 (témoins).		1 855-1 515	12,540	15,325	30,570	97,070
1852-1853-1854-1855 (traités).		1 830-1 390	6,370	8,895	23,450	55,100

(1) On notera que la pesée des organes des cobayes 1858 et 1855 a pu être effectuée seulement une heure vingt après l'autopsie. De ce fait, les poids sont légèrement diminués par la dessiccation.

Une même conclusion ressort de l'étude des différents groupes ganglionnaires même en tenant compte de l'élément d'incertitude que représente pour les ganglions inguino-cruraux l'élimination locale des ganglions caséifiés :

TABLERAU II. — Poids des différents groupes ganglionnaires.

NUMÉRO des cobayes	GANGLIONS inguinaux-cruraux gauches	GANGLIONS inguinaux droits	GANGLIONS préaortiques	GANGLIONS mésentériques	GANGLIONS trachéo-bronchiques	GANGLIONS axillaires	GANGLIONS cervicaux	POIDS TOTAL des ganglions
1857 (témoin).	1,270	0,120	0,250	0,450	0,410	0,050	0,100	2,650
1853 (traité).	0,950	0,075	0,200	0,180	0,200	0,050	0,100	1,755
1859 (témoin).	0,850	0,100	0,480	0,600	1,050	0,100	0,450	3,330
1854 (traité).	0,650	0,100	0,220	0,250	0,100	0,080	0,100	1,500
1858 (témoin).	1,430	0,060	0,710	0,345	0,740	0,090	0,050	3 425
1855 (traité).	1,100	0,050	0,320	0,350	0,320	0,070	0,100	2,310
1856 (témoin).	2,370	0,450	0,850	0,700	1,450	0,250	0,450	5,920
1852 (traité).	0,700	0,060	0,450	1,020	0,750	0,200	0,150	3,330

En résumé, des cobayes traités par la tuberculine, soumis à une infection tuberculeuse massive, et absorbant une dose importante de *p*-amino-benzène sulfonyl thiourée, ont présenté, entre le trentième et le cinquante-septième jour après l'inoculation, des lésions tuberculeuses moindres que les témoins. Ces résultats confirment ceux qu'une expérimentation plus importante nous a donnés, entre le cent trente-huitième jour et le cent cinquante-troisième jour, chez le cobaye désensibilisé par la tuberculine, infecté par une dose bacillaire considérablement plus faible et absorbant du *p*-amino-phényl sulfamide. Ils semblent indiquer la valeur générale de la méthode.

**CONTRIBUTION**  
**A L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME RESPIRATOIRE**  
**DES BACILLES PARATUBERCULEUX (\*)**

**I. — MÉTABOLISME RESPIRATOIRE DU BACILLE DE LA FLÉOLE**

par A. ANDREJEW.

*(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches sur la tuberculose.)*

Les analogies qui existent entre les bacilles paratuberculeux et les bacilles tuberculeux ont suscité de nombreux travaux.

Cependant, bien que tous ces germes soient des aérobies, l'étude de leur métabolisme respiratoire n'a pas encore reçu tous les développements nécessaires. Les besoins en oxygène libre étant très étroitement liés à l'assimilation, à la croissance, à la vitalité en général de ces bacilles, il nous a paru utile de préciser tout d'abord la question de la consommation d'oxygène au cours de leur culture.

Les besoins des bacilles en oxygène atmosphérique, les variations de ces besoins au cours de la végétation, l'analyse expérimentale des causes de ces variations, telles sont les questions principales du problème que nous traitons dans cette partie de notre étude.

Après avoir précisé les besoins en oxygène dans les conditions normales de culture, nous avons cherché à faire varier ces conditions de manière à mettre en évidence l'importance de l'oxygène, ainsi que l'influence de ces conditions imposées sur le métabolisme respiratoire et la vitalité des bacilles.

C'est ainsi que nous avons étudié l'influence de l'âge de la culture sur la respiration des bacilles d'une part en fonction de l'aérobiose, d'autre part en fonction de l'anaérobiose.

Dans certains cas nous complétons l'étude de l'anaérobiose par l'étude de l'influence du jeûne.

Notre étude comprend deux parties :

La première est consacrée au métabolisme respiratoire des bacilles paratuberculeux ; dans l'autre nous exposerons les divers problèmes de la respiration des bacilles tuberculeux.

(\*) Association des Microbiologistes de Langue française, séance du 5 juillet 1945.



# I. — Influence de l'âge de la culture sur les échanges respiratoires du bacille de la fiéole.

## A. — ETUDE DE LA RESPIRATION APRÈS L'AÉROBIOSE.

*Méthode.* — Plusieurs ballons de milieu de Long sont ensemencés avec des bacilles de la fiéole, capuchonnés et laissés à 38°. A divers intervalles des fragments de voile sont prélevés et essorés. On pèse ensuite 0,2 g. ou 0,4 g. de bacilles, selon l'âge de la culture et on les met en suspension dans 10 c. c. de milieu de Long fraîchement préparé. On prélève 1 c. c. de cette suspension et on en mesure la respiration dans un manomètre de Warburg, dont le thermostat est réglé à 37°5. Le reste de la suspension permet d'effectuer le dosage pondéral des bacilles secs et, s'il est nécessaire, d'ensemencer sur milieu de Löwenstein.

Le dosage des bacilles secs consiste à centrifuger fortement une quantité donnée de l'émulsion bacillaire dans un tube préalablement séché et taré. On opère de préférence sur des quantités de suspension susceptibles de donner un poids de bacilles secs supérieur à 0,05 g. Ensuite on lave le culot bacillaire afin d'enlever toutes les traces du milieu de culture et on centrifuge de nouveau jusqu'à ce que le liquide surnageant devienne parfaitement limpide. Enfin, on sèche le tube contenant le culot bacillaire, à 60°, jusqu'à poids constant, après refroidissement, dans un dessiccateur. Un calcul simple permet d'établir le poids des bacilles secs contenus dans la prise d'essai que nous employons pour nos mesures respiratoires.

Les chiffres que nous donnons représentent des millimètres cubes d'oxygène consommés par 1 mg. de bacilles secs et par heure.

*Résultats.* — 1° Le fait principal qui se dégage de cette expérience est la chute rapide de la respiration avec le vieillissement de la culture.

	CONSUMMATION d'oxygène en millimètres cubes
Du 4 <sup>e</sup> au 8 <sup>e</sup> jour. . . . .	63
Au 12 <sup>e</sup> jour. . . . .	40
Au 15 <sup>e</sup> jour. . . . .	23
Au 18 <sup>e</sup> jour. . . . .	10
Au 20 <sup>e</sup> jour. . . . .	2
Au 23 <sup>e</sup> jour. . . . .	1 à 0

La respiration baisse assez rapidement à partir du huitième jour et tend vers 0 au voisinage du vingtième jour. Cette baisse de la respiration est due essentiellement à la mort des bacilles. En effet, si l'on effectue des ensemencements à différents moments on voit que le vingt-deuxième jour la proportion des

bacilles vivants n'est plus que de 2,5 p. 100 par rapport au septième jour. Il convient donc d'admettre que la baisse de la respiration de la culture du bacille de la fièvre au même moment ne traduit rien d'autre que la présence d'un nombre incomparablement moins élevé de germes vivants.

2° Cette baisse est d'autant plus rapide que l'aération est plus déficiente. En effet si nous opérons sur des cultures complètement aérées — c'est-à-dire décapuchonnées — nous obtenons des chiffres tout à fait différents des premiers. Notamment la mortalité bacillaire après vingt jours d'étuve devient sensi-

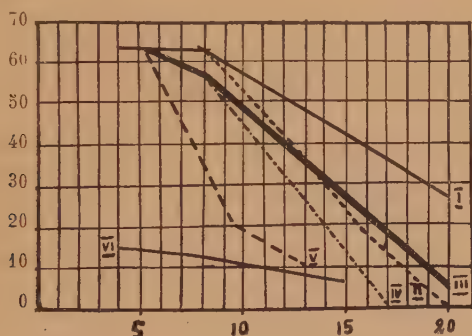


FIG. 1. — Influence de l'âge de la culture sur la respiration du bacille de la fièvre.

- I. Dans le milieu de Long frais (après une culture aérée). II. Dans le milieu de Long frais (après une culture capuchonnée). III. Dans le milieu de Long altéré (après une culture aérée). IV. Dans le milieu de Long altéré (après une culture capuchonnée). V. Dans le milieu de Long frais (après l'anaérobiose). VI. Dans la solution de famine.

Abscisse : Jours de culture.

Ordonnée : Millimètres cubes d'oxygène consommés par milligramme de bacilles secs et par heure.

blement moindre : au lieu de 97,5 p. 100 elle n'est plus que de 60 p. 100.

D'autre part la respiration de la culture est plus prolongée et on observe que les bacilles consomment 27 mm<sup>3</sup> d'oxygène par milligramme et par heure au vingtième jour.

3° La mesure des échanges respiratoires des bacilles permet de résoudre la question de savoir si le vieillissement du milieu de culture n'apporte pas par lui-même un facteur défavorable à la respiration bacillaire indépendamment de la mortalité générale.

Pour élucider ce point nous avons procédé à des mesures supplémentaires de la respiration portant sur des bacilles qui étaient placés non dans du milieu de Long frais au moment de la

mesure de la respiration, mais dans le milieu de Long ayant servi à leur culture.

Dans ces conditions, on observe que, jusqu'au cinquième jour, la respiration est la même que pour les bacilles placés dans le milieu de Long frais; ensuite on constate, pour les bacilles placés en milieu de Long altéré, une différence en moins assez sensible :

Au huitième jour les bacilles placés dans le milieu de Long usé consomment :

	57 mm <sup>3</sup> d'oxygène contre 63 mm <sup>3</sup> dans le milieu de Long frais.		
Au 12 <sup>e</sup> jour 28	—	40	—
Au 15 <sup>e</sup> jour 12	—	23	—
Au 17 <sup>e</sup> jour 02 à 0 mm <sup>3</sup>	—	10	—

Ces expériences ont été faites sur des cultures capuchonnées. Dans une culture aérée, la durée totale de la respiration augmente également dans le milieu de Long usagé. C'est ainsi qu'au vingtième jour nous avons obtenu une consommation d'oxygène de 3 mm<sup>3</sup> dans le milieu de Long altéré contre 27 mm<sup>3</sup> dans le même milieu frais.

*Conclusion.* — On voit ainsi que la diminution des échanges respiratoires du bacille de la fièvre en fonction de l'âge de la culture est conditionnée par deux facteurs : d'une part, la mortalité générale des bacilles, d'autre part, l'altération progressive du milieu qui devient de moins en moins favorable au métabolisme bacillaire.

#### B. — ETUDE DE LA RESPIRATION APRÈS L'ANAÉROBIOSE.

*Méthode.* — Le bacille de la fièvre estensemencé sur plusieurs ballons de milieu de Long. Ces ballons sont munis d'un tube indicateur fermé à la base et dont la partie ouverte déborde le niveau du milieu liquide. On place ces tubes de façon à éviter une introduction du milieu et de pouvoir les atteindre avec la pointe d'une pipette. Les ballonsensemencés sont laissés à l'étuve à 38° pendant cinq jours. Lorsque le voile devient suffisamment abondant on introduit alors dans le tube indicateur le mélange suivant (préparé extemporanément) à partir des solutions stériles de

Bleu de méthylène à 0,2 p. 100. . . . .	11 gouttes.
Glucose à 22 p. 100. . . . .	1 c. c.
Eau alcalinisée par la soude jusqu'au pH : 9 . . . . .	10 c. c.

On ferme ensuite les ballons au coton et on enfonce par-dessus un bouchon de caoutchouc très étanche muni d'un petit robinet. Après paraffinage, on fait à la trompe un vide assez poussé jusqu'à 70 cm. de mercure. On porte ensuite les ballons à l'étuve. Les traces d'oxygène qui restent dans les ballons sont vite absorbées par la double action réductrice, d'une part du glucose en milieu alcalin qui se trouve dans le tube indicateur; d'autre part par les bacilles eux-



mêmes. En général, une nuit à l'étuve suffit pour assurer l'anaérobiose totale dans les ballons. Le début de l'anaérobiose totale est signalé par le fait que l'indicateur bleu à l'origine devient incolore. En effet, le glucose qui est réducteur en milieu alcalin, après avoir absorbé les traces d'oxygène atmosphérique, réduit le bleu de méthylène et le transforme en son leucodérivé.

A des intervalles donnés et sur des ballons différents, on prélève des fragments de voile, on essore et pèse les bacilles ; on les met en suspension et on étudie leur métabolisme respiratoire aux dépens du milieu de Long frais, avec l'appareil de Warburg dont le thermostat est toujours réglé à 37°5.

**Résultats.** — Les résultats ainsi obtenus s'opposent et complètent les résultats précédents :

En trois à quatre jours de vide on obtient une chute extrêmement rapide de la respiration des bacilles de la fléole : la consommation d'oxygène exprimée en millimètre cube par milligramme de bacilles secs et par heure dans le milieu de Long frais tombe de 63 à 23 et à 10 en une semaine.

En trois à quatre jours de vide, nous obtenons à peu près la même mortalité qu'après vingt jours d'une culture aérée et conservée à 38°.

**Conclusion.** — La présence d'oxygène atmosphérique est d'une importance capitale pour la culture du bacille de la fléole. Une culture simplement capuchonnée de ce bacille se ressent déjà de la pénurie d'oxygène et la courbe de sa respiration, comme la courbe de la mortalité, reste intermédiaire entre celle de l'aérobiose complète et celle de l'anaérobiose.

## II. — Influence du jeûne sur le métabolisme respiratoire du bacille de la fléole.

L'étude de l'influence d'un jeûne de durée variable sur la respiration bacillaire n'est pas sans intérêt :

Tout d'abord elle complète l'étude de la respiration après anaérobiose. En effet, lorsque la baisse de l'intensité respiratoire causée par le jeûne est nettement plus forte que la baisse causée par une anaérobiose de même durée en présence du milieu nutritif, on est en droit d'en conclure que l'assimilation n'est pas arrêtée par le manque d'oxygène libre et qu'un certain état d'anaérobiose est possible pour ces bacilles. Par contre le parallélisme entre la baisse respiratoire provoquée par le jeûne et la baisse causée par une anaérobiose de même durée indique que toute assimilation cesse avec le manque d'oxygène libre et que le bacille de la fléole est par suite un aérobie strict.

En outre, Loebel, Richardson et Schorr (1) ont déjà employé

(1) *J. Bact.*, 1933, 26, 139-167.

cette méthode du jeûne pour étudier l'intensité de la respiration du bacille de Koch dans différents milieux : les bacilles cultivés sur le milieu de Long en étaient ensuite séparés, puis mis au jeûne pendant plusieurs jours afin que tout résidu de ce milieu entraîné avec les bacilles soit consommé ; enfin les bacilles étaient reportés sur les milieux nouveaux dont il s'agissait d'étudier la valeur nutritive. Or, on peut se demander si un jeûne de plusieurs jours n'exerce pas par lui-même une action léthale sur un nombre important de bacilles paratuberculeux. S'il en était ainsi, la respiration ultérieure, dans le milieu à étudier, serait plus faible, la valeur nutritive de ce milieu apparaîtrait bien moindre et il y aurait là une cause d'erreur importante.

Pour élucider ce point nous avons soumis des bacilles de la fièvre à un jeûne de durée variable, après quoi nous avons mesuré leur respiration.

*Méthode.* — La technique employée était la suivante : des bacilles de la fièvre cultivés huit à neuf jours sur le milieu de Long sont placés dans une solution dite de famine (composée d'eau physiologique à 9 g. de NaCl par litre, tamponnée par du phosphate de sodium M/150 pH = 7,4), où ils sont laissés un temps variable. Ensuite on les prélève et on mesure leur respiration dans le milieu de Long d'une part, dans la solution de famine d'autre part.

Voici pourquoi il est nécessaire de procéder à cette double mesure.

Lorsque, après le jeûne, les bacilles sont replacés dans le milieu de Long, ils y retrouvent d'emblée tous les éléments nutritifs nécessaires. Si malgré cela la respiration est affaiblie, c'est que le jeûne a tué un certain nombre de bacilles, nombre d'autant plus grand que la diminution de la respiration est plus prononcée.

Au contraire, lorsque la respiration des bacilles ayant jeûné un certain temps est mesurée dans le milieu de famine, elle ne peut se faire qu'aux dépens des particules nutritives emportées par les bacilles ; c'est dire que si la respiration s'avère plus basse après un jeûne plus long, cette baisse traduit non seulement l'action léthale propre du jeûne, mais encore l'épuisement de ces réserves nutritives, que les bacilles restés vivants pouvaient utiliser.

Ainsi la respiration des bacilles sur le milieu de Long fournit la mesure de la mortalité produite par le jeûne ; celle des bacilles sur le milieu de famine, la mesure de la mortalité produite par le jeûne et de l'épuisement progressif des parcelles nutritives emportées.

*Discussion de la méthode.* — Avant de justifier ce moyen d'appréciation de la mortalité bacillaire, il nous faut envisager le point suivant : pris isolément les bacilles sont-ils capables, dans les mêmes conditions, de consommer des quantités variables d'oxygène selon leur âge?

La réponse négative nous a été donnée récemment par C. O. Oldfelt (2). Le rapport entre croissance et consommation de  $O^2$  reste constant. Il n'existe pas, au point de vue de la consommation d'oxygène, de « jeunesse physiologique », c'est-à-dire de phase dans laquelle la consommation de  $O^2$  serait proportionnellement plus forte par rapport au même volume de microbes.

Donc, puisque nous constatons, au cours de la culture, une baisse de la respiration bacillaire mesurée aux dépens du milieu neuf, la mortalité bacillaire devient par suite évidente et proportionnelle à cette baisse.

Ceci nous paraît d'autant plus exact que nous avons éliminé les causes d'erreur éventuelle dues à des variations du pH, de la pression osmotique ou à des oxydations secondaires (telles, par exemple, que l'oxydation des produits du métabolisme bacillaire ou des produits de leur décomposition, diffusés dans le milieu), par l'emploi de milieu de culture neuf et de témoins. Les bacilles placés dans le milieu de culture neuf, pendant quelques heures, se retrouvaient toujours sous l'influence des mêmes conditions physico-chimiques. Par conséquent, les variations des surfaces de germes vivants n'ont pas dû jouer un rôle appréciable dans nos mesures.

D'autre part, les témoins nous ont montré que les oxydations secondaires, et en particulier l'oxydation des bacilles morts, infiniment plus lente que la respiration des bacilles paratuberculeux vivants, n'influent nullement sur nos mesures effectuées dans les conditions décrites.

Du reste, en supposant même que ces oxydations secondaires puissent jouer un rôle plus important, cela ne pourrait amener qu'une augmentation de la consommation d'oxygène et non pas, comme nous l'avons constaté, une baisse, baisse d'autant plus prononcée que la culture est plus âgée.

Par ailleurs, le fait de la mortalité bacillaire croissante au cours du jeûne, comme au cours de la culture, se trouve confirmé par un autre indice important : la diffusion croissante des protéides bacillaires, tant dans le milieu de famine que dans le milieu nutritif, diffusion liée étroitement à la diminution du poids sec de la récolte microbienne totale.

En outre, l'évaluation de la mortalité bacillaire au moyen des mesures respiratoires, sans être absolue, ne paraît pas être moins fidèle que celle fournie par la méthode des ensemencements que nous avons employée couramment, à titre de contrôle.

**Résultats.** — Voici les chiffres de la consommation d'oxygène que nous avons obtenus par milligramme de bacilles secs et par heure :

(2) *Acta Med. Scand. Suppl.* 132, 260, Stockholm, 1942.



## a) Sur le milieu de Long :

Après 0 jour de jeûne . . . . .	63 mm <sup>3</sup>
Après 1 jour de jeûne . . . . .	57 —
Après 2 jours de jeûne . . . . .	51 —
Après 5 jours de jeûne . . . . .	43 —
Après 10 jours de jeûne . . . . .	30 —
Après 20 jours de jeûne . . . . .	21 —

Ces chiffres montrent qu'autour des cinq premiers jours du jeûne la respiration tombe de 63 à 43, soit de 30 p. 100 environ.

## b) Sur le milieu de famine :

Après 0 jour de jeûne . . . . .	47 mm <sup>3</sup>
Après 1 jour de jeûne . . . . .	15 —
Après 2 jours de jeûne . . . . .	12 —
Après 5 jours de jeûne . . . . .	08 —
Après 10 jours de jeûne . . . . .	06 —
Après 20 jours de jeûne . . . . .	03 —

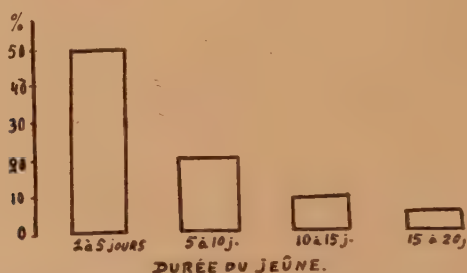


FIG. 2. — Baisse de l'intensité respiratoire du bacille de la fléole pendant le jeûne.

Ordonnée : Baisse de l'intensité respiratoire.

Au delà du vingtième jour les valeurs sont comprises entre 10 et 0.

Au cours des cinq premiers jours de jeûne la respiration tombe donc de 17 à 8, soit de 50 p. 100 environ.

Etant donné que la chute de la respiration sur le milieu de Long mesure la seule mortalité des bacilles, tandis que celle du milieu de famine mesure la mortalité et l'épuisement des réserves nutritives, on voit que l'épuisement progressif de ces réserves est responsable d'une chute respiratoire qui s'élève de 15 à 20 p. 100 pour les cinq premiers jours de jeûne.

D'autre part l'étude des chiffres montre qu'entre cinq et dix jours de jeûne la chute de la respiration devient proportionnellement de même importance pour les deux milieux, ce qui indique que les parcelles nutritives emportées sont alors pratiquement épuisées. Il persiste à ce moment dans le milieu de famine une respiration résiduelle des plus faibles et qui va même en diminuant.

*Conclusion.* — On peut conclure de ces recherches que le jeûne

a une action léthale non négligeable sur le bacille de la fiéole. Aussi la méthode qui consiste à faire jeûner les bacilles acido-résistants pendant plusieurs jours avant d'étudier leur respiration sur de nouveaux milieux n'est-elle pas sans inconvénients, tout au moins en ce qui concerne le bacille de la fiéole.

Elle écarte certes la respiration qui s'effectue aux dépens des parcelles nutritives emportées du milieu initial, mais elle apporte une cause d'erreur due à ce fait que le jeûne tue par lui-même un nombre important de bacilles.'

### III. — Influence de la température sur le métabolisme respiratoire du bacille de la fiéole.

Nous complétons notre étude par quelques mesures de l'intensité respiratoire d'une culture de ce bacille conservée à la température du laboratoire, c'est-à-dire aux environs de 20°.

*Méthode.* — Le bacille de la fiéole est ensemencé sur plusieurs bal-



FIG. 3. — Respiration d'une culture du bacille de la fiéole conservée à 20°.

I. Dans le milieu de Long frais. II. Dans le milieu de Long altéré.

Abcisse : Jours de culture.

Ordonnée : Millimètres cubes d'oxygène consommés par milligramme de bacilles secs et par heure.

lons de milieu de Long et porté à l'étuve à 38°. Après cinq jours, les ballons sont retirés de l'étuve et laissés à la température du laboratoire. A des intervalles donnés, on mesure la respiration bacillaire au moyen de l'appareil de Warburg, dont le thermostat est réglé à 20°. Les mesures de la respiration se font dans le milieu de Long frais et dans le milieu de Long altéré.

*Résultats.* — Les résultats obtenus sont les suivants :

a) Consommation d'oxygène dans le milieu de Long frais :

Au 5 <sup>e</sup> jour. . . .	15 mm <sup>3</sup>	d'oxygène par mg. de bacilles secs et par heure.	
Au 12 <sup>e</sup> jour. . . .	14	—	—
Au 20 <sup>e</sup> jour. . . .	14	—	—
Au 27 <sup>e</sup> jour. . . .	12	—	—
Au 34 <sup>e</sup> jour. . . .	11	—	—

b) Consommation d'oxygène dans le milieu de Long usagé :

Au 5 <sup>e</sup> jour. . . .	13 mm <sup>3</sup>	d'oxygène par mg. de bacilles secs et par heure.	
Au 12 <sup>e</sup> jour. . . .	09	—	—
Au 20 <sup>e</sup> jour. . . .	07	—	—
Au 27 <sup>e</sup> jour. . . .	02	—	—
Au 34 <sup>e</sup> jour. . . .	01 à 0 mm <sup>3</sup>	—	—

La chute rapide de la respiration débute aux environs du vingtième jour.

Vers le trentième jour la consommation d'oxygène devient en milieu de Long altéré inférieure à  $1,5 \text{ mm}^3$ .

*Conclusion.* — La comparaison de ces observations avec les précédentes met en évidence une différence appréciable dans la durée des échanges respiratoires de la culture.

On note également une différence importante dans la consommation d'oxygène selon que la respiration est mesurée dans le milieu de Long frais ou dans le milieu de Long altéré. Ceci confirme la faible mortalité des bacilles cultivés dans ces conditions.

Les ensemencements consécutifs sur le milieu de Löwenstein montrent le trentième jour une diminution du nombre des bacilles vivants. Entre le septième jour et le trentième jour, cette diminution est de 20 p. 100.

La respiration comparative, mesurée aux dépens du milieu de Long frais, très légèrement inférieure le trentième jour au palier marqué au début, confirme le résultat obtenu par les ensemencements.

Malgré une très faible respiration dans le milieu de Long altéré par un mois de culture, la mortalité bacillaire est nettement moindre à  $20^\circ$  qu'à  $38^\circ$ .

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus dans les expériences précédentes nous permet d'affirmer que la mortalité des bacilles de la fléole, cultivés à  $38^\circ$  en aérobiose, n'est pas conditionnée exclusivement par l'ensemble des facteurs qui déterminent l'altération du milieu. La température y joue un rôle très important : les bacilles de la fléole se trouvant dans le même milieu altéré meurent dans le même laps de temps en beaucoup plus grand nombre à  $38^\circ$  qu'à  $20^\circ$ .

Le développement initial de la culture se trouve favorisé à  $38^\circ$  durant la première semaine ; ensuite la même température favorise la mortalité bacillaire.

Par contre, à  $20^\circ$ , le développement initial se trouve relativement entravé et ralenti mais la mortalité bacillaire des cultures âgées se trouve nettement diminuée.

### Résumé et conclusions.

L'influence de l'âge de la culture sur la respiration du bacille de la fléole — après aérobiose à  $38^\circ$  — comporte deux phases :

La première est marquée par la constance des échanges respiratoires, par unité de bacilles et aux dépens du milieu neuf.

La deuxième, relativement plus longue, est caractérisée par une baisse progressive de la respiration dans les mêmes conditions.

Les mesures respiratoires effectuées dans des conditions spé-



ciales nous ont permis de mettre en évidence et de préciser l'influence de deux facteurs distincts sur l'intensité respiratoire de la culture au cours de ces deux périodes.

La respiration est étroitement liée :

A la mortalité bacillaire ;

A l'altération du milieu.

La constance de la respiration pendant la première période, qui correspond à la phase logarithmique de la croissance de la culture, exclut une mortalité microbienne appréciable.

Par contre, la baisse de l'intensité respiratoire pendant la deuxième période, qui commence à la fin de la phase logarithmique et aux environs du « maximum » de croissance, dénote l'influence spécifique de chacun de ces facteurs. Ainsi, la baisse du milieu. Des mesures respiratoires, effectuées dans des conditions spéciales, nous ont permis de séparer et de préciser l'influence spécifique de chacun de ces facteurs. Ainsi, la baisse des échanges respiratoires, mesurée aux dépens du milieu neuf, devient l'indice de la mortalité seule.

Par contre, la baisse de la respiration dans le milieu altéré par la culture étant due à la fois à la mortalité bacillaire et à l'altération du milieu, la différence entre ces deux mesures correspond donc à l'influence de la seule altération du milieu.

Nous avons ainsi des indices spécifiques, d'une part pour la mortalité bacillaire et, d'autre part, pour l'altération du milieu ; et les courbes dressées à cet effet permettent d'apprécier l'influence de chacun de ces facteurs pris séparément sur la baisse des échanges respiratoires au cours de la culture.

Le fait principal qui se dégage de ces observations est une mortalité bacillaire très importante et rapide à la température de 38° et qui commence aux environs du « maximum » de croissance. L'étude comparative de la respiration du bacille de la fièvre à 20° montre que la température de 38° exerce tout d'abord une action très favorable sur la vitalité des germes, pendant une semaine environ. Ensuite cette même température exerce une action létale très rapide. Par contre la température de 20° ralentit considérablement la croissance bacillaire lors de la phase logarithmique mais n'exerce pas par elle-même une action létale appréciable lors de la phase suivante.

L'intensité respiratoire d'une culture de bacille de la fièvre est étroitement liée aux conditions d'aérobiose. La chute de la respiration est d'autant plus rapide que la pénurie en oxygène devient plus grande. Cette chute est causée essentiellement par la mortalité bacillaire.

L'anaérobiose complète provoque une chute respiratoire extrêmement rapide.

Les ballons simplement capuchonnés présentent à 38° une

mortalité intermédiaire entre celle de l'aérobiose complète et celle de l'anaérobiose.

Le jeûne exerce à peu près la même action léthale que l'anaérobiose.

Cependant, dans tous les cas, la mortalité bacillaire importante n'exclut pas la survie plus ou moins prolongée de rares éléments.

# TEMPÉRATURE DU SINGE

## AU COURS DE LA POLIOMYÉLITE EXPÉRIMENTALE

### DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>2</sub> DANS QUELQUES ORGANES

par B. KOLOCHINE-ERBER et A. RAFFY.

*(Institut Pasteur, Service de M. Dujarric de la Rivière  
et Institut océanographique, Laboratoire de M. Portier.)*

La poliomyélite expérimentale du Singe, comme la maladie humaine, lèse presque exclusivement le système nerveux et laisse à peu près intacts les principaux viscères : le foie, en particulier, n'est pas atteint. Après l'inoculation, même après l'injection intracérébrale, rien de spécial ne s'observe pendant l'incubation jusqu'à la période préparalytique caractérisée par des signes cliniques et par l'élévation de la température centrale. Quand les phénomènes paralytiques apparaissent, la température baisse et l'animal meurt en hypothermie au bout de quelques jours. De plus, M. Fontaine et A. Raffy [1] ayant établi le rôle de l'hépatoflavine dans la thermorégulation des homéothermes, on pouvait se demander si, dans la poliomyélite du Singe, le taux de cette substance n'était pas abaissé et si cette action modificatrice du métabolisme ne venait pas se joindre à celle des autres facteurs qui commandent l'hypothermie à la phase finale de la maladie : ralentissement de la circulation et stase sanguine, gêne respiratoire, inanition relative, conséquences de la paralysie et qui agissent au maximum quand le Singe est quadriplégique.

Pour résoudre cette question nous avons dosé la riboflavine dans les organes de Singes poliomyélitiques qui avaient été inoculés pour fournir des moelles virulentes destinées à la préparation du sérum antipoliomyélitique. Les mêmes organes de Singes neufs ont servi de témoin.

Les animaux ont été inoculés dans le cerveau et dans la cavité péritonéale avec des émulsions dans l'eau physiologique de moelles virulentes de Singes morts de poliomyélite, conservées à la glacière dans la glycérine. La dose a varié suivant le poids des animaux, de 0,3 c. c. à 1 c. c. dans le cerveau, de 1 à 2 c. c. dans la cavité péritonéale. Les plus petits pesaient 1.600 g., les plus gros atteignaient 8 kg., ceux de poids moyen, les plus nombreux, 2.200 g. à 5.500 g. L'évolution et la durée de la maladie



ne sont pas en rapport direct avec la quantité de virus inoculée, ce qui prouve une fois de plus la sensibilité variable du Singe à l'infection poliomyélitique. La maladie a duré de six à dix-neuf jours, mais, dans la plupart des cas, elle a évolué en sept à neuf jours.

Les animaux étaient observés plusieurs fois par jour. Chaque fois que les circonstances l'ont permis ils étaient sacrifiés par saignée à la période agonique et l'autopsie était faite immédiatement. Quand l'animal mourait et que la moelle ne pouvait être prélevée tout de suite, le cadavre était conservé à la glacière jusqu'à la nécropsie, qui avait lieu quelques heures après. Les organes étaient prélevés aseptiquement et conservés en boîte de Petri stérile, à la glacière, jusqu'au moment du dosage.

#### TEMPÉRATURE DU SINGE NORMAL ET DU SINGE POLIOMYÉLITIQUE.

Certains auteurs attachent peu d'importance aux courbes de température obtenues chez les Singes [2] ; pour eux, la capture fatigue les animaux et les résultats sont aléatoires. Il est certain que la température ne doit pas être prise quand l'animal vient de se débattre et que la respiration est accélérée ; les chiffres lus ne sont valables que si les animaux sont laissés au repos après la capture pendant au moins une demi-heure, maintenus par un appareil de contention ou attachés sur un plateau, sauf quand les Singes, déjà apprivoisés, se laissent prendre dans la cage sans opposer de résistance.

La température du Singe normal est supérieure à celle de l'Homme ; pour nos animaux, avant l'inoculation, elle n'a jamais été inférieure à 37°8 et n'a pas dépassé 39°.

Pour le Singe poliomyélitique, quelques règles aussi doivent être respectées pour que les chiffres lus puissent être tenus comme exacts. Il est plus délicat d'apprécier la marche de la thermogénèse chez le Singe poliomyélitique que chez le Singe non malade, au moins pendant la phase préparalytique et lors de l'apparition des paralysies. Immédiatement après l'inoculation, durant les deux à sept ou huit jours qui suivent, l'animal en expérience ne présente rien de spécial, la température reste sans changements remarquables, puis elle commence à s'élever pendant un à trois jours en même temps qu'apparaissent les phénomènes cliniques qui caractérisent la période préparalytique : agitation, instabilité des mouvements, tremblement des membres, anxiété, fatigabilité. L'élévation de température au stade préparalytique a été mentionnée par Hurst [3] dans des protocoles d'expérience; Ionesco Mihaiesti, Tupa, Wisner et Mesrobeanu [4] notent une fièvre de 41° à 41°5 ; Harmon, Shaughnessy et Gordon [5] remarquent une augmentation de 1° à 3° Fahrenheit qui précède les

paralysies de un à cinq jours. Aycock et ses collaborateurs, Deimle, Howitt [6, 7, 8] ont aussi noté des températures élevées, supérieures à 41° (41°6) pour la même période de la maladie. Dujarric de la Rivière, Lépine, B. Kolochine-Erber et V. Sautter [9], au cours d'une expérience destinée à éprouver la valeur du chlorate de potasse dans la poliomyélite, ont trouvé des températures supérieures à 40° (40°4) ; les Singes étaient petits ou de taille moyenne, ils pesaient 1.380 g. à 3.730 g.

Quand les paralysies commencent à s'établir, l'agitation fait place à la prostration, le facies devient douloureux et ces signes augmentent en même temps que la disparition du mouvement devient plus accentuée. Dès ce moment la température diminue et continue à baisser tant que progressent les paralysies. Le fait est particulièrement net quand la paralysie, commençant par les membres inférieurs est régulièrement ascendante ; il semble l'être moins pour les Singes dont la paralysie touche d'abord les membres supérieurs. Dans ce dernier cas, la maladie évolue rapidement, les phénomènes bulbaires se manifestent très tôt et l'animal survit moins longtemps à l'inoculation. Pour le Singe de taille moyenne ou grande, la capture devient dangereuse quand les paralysies commencent à envahir les membres. L'animal est encore capable d'opposer une résistance très vive qui le fatigue plus vite qu'à l'état normal, aggrave les symptômes, active l'extension des paralysies et peut déterminer l'apparition précoce de phénomènes bulbaires capables d'entraîner la fin brusque de l'animal en expérience. Sauf chez les petits Singes, il est impossible de prendre la température quand commencent les paralysies, car l'animal ne peut être retiré de sa cage sans risques pour l'évolution de la maladie ; c'est seulement quand la quadriplégie est installée, la tête seule restant mobile, que l'on peut utiliser le thermomètre puisque le Singe n'offre plus de résistance.

Les auteurs citent peu de mesures de température au cours de l'évolution des paralysies, le plus souvent sans dire dans quelles conditions elles ont été effectuées. Les chiffres de 34°2 et 36°1 [4] ont dû être lus assez longtemps avant la période finale.

Pour les Singes dont les organes devaient servir aux dosages de la riboflavine, la température a été prise une fois seulement au cours de la période préparalytique, afin de ne pas fatiguer inutilement les animaux dont l'affection devait évoluer librement. Le plus souvent aussi la seconde mesure de la température n'a été faite qu'une fois, quand les paralysies étaient nettement établies, mais dans quelques cas, surtout pour les plus petits Singes, cette mesure a été renouvelée trois à quatre fois.

Au cours de la période préparalytique la température la plus

élevée a été 40°4. Les chiffres notés pour des Singes quadriplégiques dont les mouvements respiratoires étaient extrêmement lents, oscillent autour de 33° (de 25 à 35°).

Quelques exemples peuvent être cités :

Callitriche ♀ 1354, poids : 1.630 g. ; température : 38°2 avant l'inoculation ; commence à être malade le sixième-septième jour, les membres postérieurs sont paresseux, l'animal est maladroit et grimpe mal : température, 39°2 ; le huitième jour les pattes postérieures sont flasques, température : 36°1 puis, la quadriplégie est installée ; on lit, le neuvième jour : température, 35°3 ; le dixième jour, 35°6 ; le onzième jour, 34°8. L'animal est sacrifié par saignée.

Babouin ♂ 1356, poids : 2.250 g. ; température : 38°6 avant l'inoculation ; le septième jour, alors que les deux membres postérieurs sont paralysés et flasques, que les membres antérieurs sont pris, sauf les doigts qui peuvent encore serrer, température : 34°2 ; le huitième jour, quadriplégie complète, température : 33°. L'animal est sacrifié par saignée cinq heures après.

Babouin ♂ 1359, poids : 2.500 g. ; température : 39° avant l'inoculation ; le huitième jour, quand la quadriplégie vient de s'installer, température : 38°8 ; le seizième jour, température : 28°. L'animal est sacrifié par saignée.

DOSAGES DE LA VITAMINE B<sub>2</sub>. — Les dosages de riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) ont été effectués par la méthode d'Euler et d'Adler, modifiée par Gourevitch [10] pour les Singes neufs et pour les trois séries de Singes inoculés. Les animaux infectés de poliomyélite étaient des Babouins et des Callitriches. Les organes d'un Magot et d'un Cynocéphale adulte ont servi exceptionnellement. Les dosages pratiqués sur des organes de Singes témoins sont moins nombreux que nous l'aurions souhaité car il était difficile de sacrifier trop de Singes neufs pour prélever uniquement des fragments témoins. Les organes des Singes non inoculés ont été fournis pour la plupart par des animaux ayant succombé spontanément au moment de leur arrivée en France ou peu de temps après leur entrée au laboratoire pendant la période d'adaptation à la vie en cages. Ces animaux ne remplissaient peut-être pas les conditions parfaites de témoins neufs, mais en tout cas ils étaient comparables aux sujets inoculés. L'ensemble des dosages a porté sur 32 Singes, répartis en trois séries de 1941 à 1943. Le tableau ci-joint présente l'ensemble des résultats.

TENEUR EN HÉPATOFLAVINE (VITAMINE B<sub>2</sub> DU FOIE) CHEZ LES SINGES TÉMOINS. — Nous ne tiendrons compte ici que des chiffres relatifs aux Callitriches. Les dosages effectués dans le foie des Singes neufs ont fourni des taux bas d'hépatoflavine de 9,7 à 14 γ par gramme de tissu frais (moyenne 12,1 γ) mais ces chiffres sont cependant à peu près du même ordre de grandeur que ceux



Teneurs en vitamine B<sub>2</sub> exprimées en  $\gamma$  par gramme  
de tissu frais.

	CŒUR	REIN	FOIE
<i>Babouins inoculés :</i>			
1941 . . . . .			15,9 12,6 11,4 12,4 16,6 15,8
1942 . . . . .	6,4 5,1 3,48 4,9 6,9 6 6,2	7,55 13,4 10,9 11 8 8,56 7	13 14,7 9,3 12,1 8,5 10,2 7,7
1943 . . . . .	6 6,3 6,12 7,3 6,5 7,4 7,1	9 9,6 9,9 11,5 12,8 9,2 8,8	11,8 11,9 12,7 14,4 16 13 10,3
<i>Callitriches neufs :</i>			
1942 . . . . .	15	19	13,4 14 12,9 10,5 9,7
Moyenne . . . . .			12,1
<i>Callitriches inoculés :</i>			
1941-1942 . . . . .	3,6	12	10,8 11,2 12 12,3 11,4
Moyenne . . . . .			11,5
<i>Cynocéphale adulte inoculé :</i>			
1941 . . . . .	7,45	10	16,2
<i>Magot inoculé :</i>			
1942 . . . . .		19	24,8

fournis par des Singes de diverses espèces étudiés antérieurement, pour lesquels les valeurs faibles étaient les plus fréquentes (5,8  $\gamma$  à 17,3  $\gamma$  ; moyenne 10,7). Donc, malgré l'état général

médiocre des Singes Callitriches témoins des séries actuelles, le taux moyen de l'hépatoflavine est cependant voisin de celui qu'on peut considérer comme normal.

**TAUX DE L'HÉPATOFLAVINE DES SINGES POLIOMYÉLITIQUES.** — Les taux d'hépatoflavine sont, en général, peu élevés et se maintiennent dans les mêmes limites que pour les Singes non inoculés. Rarement compris entre 13 et 16  $\gamma$ , ils sont en majorité inférieurs à 13  $\gamma$ , parfois même à 10  $\gamma$ . Le Magot a fourni la teneur élevée de 24,8  $\gamma$ , mais cet exemple unique ne permet pas de modifier nos interprétations.

**TAUX DE VITAMINE B<sub>2</sub> DES REINS ET DU CŒUR.** — Dans les séries de Babouins de 1942-1943, nous avons aussi dosé la vitamine B<sub>2</sub> dans le cœur et les reins des animaux inoculés. Les teneurs du rein sont faibles (en général inférieures à 10  $\gamma$ ). Celles du cœur sont du même ordre de grandeur que pour les autres Mammifères (6-7,4  $\gamma$ ).

..

Ainsi, au cours de la poliomyélite expérimentale du Singe, on aurait pu s'attendre à trouver un abaissement de la réserve en vitamine B<sub>2</sub> du foie, mais cet abaissement est faible et irrégulier. Est-il du reste imputable à l'infection et réellement en relation avec l'hypothermie ? Ne doit-on pas plutôt penser à une carence alimentaire ? En effet, l'hypothermie ne se manifeste que pendant peu de temps (deux à trois jours) alors que l'animal déjà paralysé, même quadriplégique ne prend plus spontanément de nourriture. Les animaux étaient nourris de pain, de carottes, de pommes de terre, régime pauvre en riboflavine et peu varié ; les aliments étaient fournis en quantité suffisante pour entretenir les sujets en bon état.

La sous-alimentation à la période terminale pourrait peut-être expliquer la faible teneur en hépatoflavine de ces animaux. Parmi les Singes inoculés, les foies de quelques Callitriches ont justement des teneurs basses en vitamines B<sub>2</sub>, donnant une moyenne de 11,5  $\gamma$  (de 10,8  $\gamma$  à 12,3  $\gamma$ ). Dans ce même lot d'animaux, pour des Callitriches neufs la moyenne a été de 12,1  $\gamma$  (9,7  $\gamma$  à 14  $\gamma$ ). Ces Singes étaient arrivés depuis peu de temps en France, après un voyage au cours duquel les animaux avaient été mal ravitaillés. Il est donc à noter que des animaux ayant eu un régime alimentaire insuffisant depuis plus de quinze jours présentaient des chiffres bas d'hépatoflavine. D'autre part, pour des Singes divers, les chiffres trouvés par M. Fontaine et A. Raffy [1] sont également bas. On peut établir une relation entre ces valeurs faibles et l'homéothermie médiocre des Primates. Ne peut-

on pas penser aussi que les Singes vivant en Europe, en captivité dans des cages, soumis à un régime alimentaire très différent de celui auquel ils ont été habitués à la colonie réagissent contre tous ces facteurs débilitants par une élaboration réduite de l'hépatoflavine ? Les taux réels de l'hépatoflavine des Singes ne seraient fournis que par des animaux vivant dans leur milieu et non dans des conditions très éloignées de l'habitat et du régime habituels.

..

Les recherches ci-dessus ont mis en évidence quelques variations de la température du Singe au cours de la poliomyélite expérimentale. La phase d'hyperthermie qui précède les phénomènes paralytiques a été pour nos Singes de 40°4 au maximum. Les animaux sont morts en hypothermie et des températures de 25° à 35° ont alors été notées.

Les dosages d'hépatoflavine chez les Singes ayant succombé à l'infection ont donné un taux moyen de 11,5 $\gamma$  (9,3 à 16,6 $\gamma$ ) qui diffère assez peu des chiffres obtenus chez des Singes neufs (moyenne 12,1 $\gamma$ ). Il ressort donc de ces résultats que l'hypothermie terminale du Singe poliomyélitique est due seulement à l'installation des phénomènes paralytiques et que la diminution du taux de l'hépatoflavine n'intervient pas.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] FONTAINE (M.) et RAFFY (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 389 et 1941, **135**, 693.
- [2] LEVADITI et LÉPINE. *Les Ultravirus des maladies humaines*, Maloine, édit., Paris, 1938 (Poliomyélite infectieuse épidémique, 517).
- [3] HURST (E. W.). *J. Bact.*, 1932, **35**, 41.
- [4] IONESCO MIHAILESTI (C.), TUPA (A.), WISNER (B.) et MESROBEANU (I.). *Arch. roumaines Path. exp. et Microbiol.*, 1929, **2**, 217.
- [5] SHAUGHNESSY (H. J.), HARMON (P. H.) et GORDON (F. P.). *J. prevent. Med.*, 1930, **4**, 149 ; *ibid.*, 131, **5**, 115.
- [6] KRAMER (S. D.), HENDRIE (K. H.) et AYCOCK (W. L.). *J. exper. Med.*, 1930, **51**, 933.
- [7] DEMME. *Deutsche Zeitschr. f. Nervenheilkunde*, 1930, **116**, 156.
- [8] HOWITT. *J. inf. Diseases*, 1932, **50**, 47.
- [9] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.), LÉPINE (P.), KOLOCHINE-ERBER (B.) et SAUTTER (V.). *Presse Médicale*, 24-27 septembre 1941, n<sup>os</sup> 83-84.
- [10] GOUREVITCH. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 125 et 527.



# PROPRIÉTÉS ET COMPOSITION DE LA TOXINE DE *WELCHIA PERFRINGENS*

## II. — ACTION LÉTHALE — EFFET NÉCROSANT ACTIVITÉ ENZYMATIQUE

par MAYLIS GUILLAUMIE, A. KREGUER et M. FABRE (\*).

(Institut Pasteur.)

La toxine élaborée par *Welchia perfringens* (1) est couramment désignée sous la dénomination de toxine *perfringens* A. Cette toxine contient plusieurs antigènes spécifiques dont les propriétés hémolytiques, nécrosantes ou fermentaires ont fait l'objet de maints travaux.

L'étude approfondie de nombreuses préparations de toxine *perfringens* A a montré qu'il existe dans certaines préparations un constituant léthal non spécifique.

### Constituant léthal non spécifique de certaines toxines *perfringens* A.

Passini, en 1905, détermine avant et après chauffage l'activité léthale de différentes cultures *perfringens* filtrées [55] ; il constate que les filtrats des cultures effectuées en bouillon glucosé à 1 ou 2 p. 100 peuvent contenir une substance toxique, dialysable, supportant sans altération appréciable une heure de chauffage à 60° ou quinze minutes d'ébullition ; Campbell [9], en 1909, et Klose, en 1916, obtiennent aussi des filtrats thermostables : ces filtrats résistent à une heure de chauffage à 80° [43]. Wassermann en 1918 [74], Kojima [44], Hirayama [37], puis Walbum et Reymann [72] mentionnent que le bacille de Welch élabore un poison qui tue instantanément les souris injectées par voie veineuse et contre lequel les sérums anti-*perfringens* A sont inefficaces ; Kojima (1922) précise que ce composé est dialysable, thermostable à 100° pendant quinze minutes et démontre que sa formation dépend de la teneur du bouillon en glucose : d'après cet auteur, *Welchia perfringens* engendre cet agent toxique dans les milieux contenant plus de 0,5 p. 100 de glucose ; dans ceux qui en contiennent moins, le bacille élabore une toxine thermolabile détruite en trente minutes à 70°.

(\*) Note présentée à la Société française de Microbiologie, séance du 7 décembre 1944.

(1) Synon : *Cl. welchii* ; *Cl. perfringens*, type A.

Toutefois, Walbum et Reymann (1933) trouvent que la substance toxique à action aiguë ne se forme pas en quantités mesurables dans les bouillons contenant jusqu'à 0,75 p. 100 de glucose ; mais, dans leurs expériences, les cultures faites en présence de 2,25 p. 100 de glucose contiennent en proportion considérable un composé non neutralisable par les sérums anti-A et qui présente la particularité de tuer l'animal pendant l'injection intraveineuse ou aussitôt après. Ce composé est fréquemment dénommé « pseudotoxine ».

Les préparations de toxine *perfringens* A effectuées par Stewart [68] en bouillon glucosé à 1 et 2,25 p. 100 sont neutralisées par les sérums anti-*perfringens*, ce qui autorise à penser que la souche utilisée par cet auteur n'élabore pas de pseudo-toxine.

Kendall et Schmitt (1926) ont signalé que 66 souches de *W. perfringens* sur 72 produisent en bouillon de viande glucosé une substance qui, ajoutée au liquide dans lequel plonge un utérus ou une anse intestinale isolée, déclenche des contractures analogues à celles que provoque l'histamine [41] ; Kendall (1927) constate que cette substance après blocage de la fonction NH<sub>2</sub> par le formol ne détermine plus de contractions [40]. Kendall et Gebauer (1930) démontrent l'élaboration de l'histamine par certaines souches de *W. perfringens* ensemencées dans du lait [42]. Shiraishi (1931) obtient dans les cultures de *W. perfringens* en bouillon foie une substance nocive *in vivo*, stable à 100°, dialysable, non spécifique, qui tue rapidement les cobayes injectés dans les veines ; l'auteur conclut que l'activité de cette substance ressemble beaucoup à celle de l'histamine [63]. Cette observation permet de supposer que la substance étudiée par Shiraishi ou Kojima est analogue à celle que Kendall a obtenue avec Schmitt et Gebauer. Adey (1935) a aussi signalé l'existence d'une pseudotoxine non spécifique dans les cultures de *W. perfringens* [1].

### Constituants spécifiques de la toxine *perfringens* A.

Les toxines *perfringens* analysées par Bull et Pritchett (1917) perdent toute nocivité en trente minutes à 70°. De l'ensemble de leurs recherches, ces auteurs déduisent que les cultures filtrées de *Welchia perfringens* contiennent avant chauffage deux substances nocives, spécifiques, thermolabiles, non dialysables : l'une détruit les globules rouges, l'autre possède des propriétés *nécrosantes* et exerce une action toxique générale [8]. Ces auteurs insistent tout particulièrement sur la notion que l'hémolysine n'est pas l'agent toxique essentiel des filtrats. Plus tard, Benzoni [4] a émis semblable opinion.

Henry en 1923 [36] admet aussi qu'il existe deux constituants toxiques, spécifiques, dans les cultures *perfringens* filtrées. Weinberg et Combiesco [76], après Bull et Pritchett, considèrent que le constituant *nécrosant* est responsable des altérations vasculaires observées dans les foyers hémorragiques que provoque dans divers organes l'injection intraveineuse de toxine *perfringens*. Tzekhnovitzer et Karouth [71] notent les réactions de la peau après injec-

tions intradermiques de toxine *perfringens* : nécrose, hyperémie et infiltration.

En 1928, Dalling, Glenny, Mason et O'Brien [41] utilisent trois méthodes pour apprécier l'activité des sérums anti-A. Ils déterminent l'action anti-hémolytique *in vitro*, l'action antitoxique globale par la technique des injections intraveineuses à la souris et le pouvoir anti-nécrosant par le procédé des injections intradermiques déjà mentionné en 1916 par Klose [43] et en 1921 par Glenny et Allen [46].

Ayant constaté au cours de leurs premières investigations que les résultats des titrages *in vitro* concordent avec ceux des dosages *in vivo*, Dalling, Glenny, Mason et O'Brien pensent qu'un même principe est responsable de l'effet hémolytique et des actions léthale et nécrosante de la toxine *perfringens* A employée dans les titrages. Mason et Glenny [52] effectuant un grand nombre de dosages par les méthodes *in vitro* et *in vivo* (souris) obtiennent des résultats conformes aux précédents et étayent ainsi la thèse de l'existence d'un seul antigène dans la toxine A. Wilsdon (1931) désigne par W l'antigène de cette toxine [84]; Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling et Ross (1933) déduisent aussi de leurs recherches que les filtrats qu'ils ont titrés ne renferment qu'un antigène et le désignent par  $\alpha$ ; c'est l'antigène W de Wilsdon.

En 1936, Weinberg et Guillaumie [77] considèrent que la toxine A est plus complexe que ne l'indiquent Wilsdon, puis Glenny et ses collaborateurs. A la suite de leurs titrages sur souris, Weinberg et Guillaumie désignent par  $a$  l'antigène léthal essentiel de cette toxine, et par  $b$  l'antigène caractéristique du bacille L. D. de Dalling et concluent que la toxine *perfringens* du bacille de Welch contient les antigènes  $a$  et  $b$  ( $b$  en très petite quantité).

Prigge (1936-1937) utilise comme souche de *Welchia perfringens* la souche A 52 P et met en évidence que les cultures très hémolytiques de cette souche contiennent en quantité abondante deux agents toxiques [57, 58]. Cet auteur désigne l'hémolysine par  $\alpha$  et par  $\zeta$  un constituant auquel il attribue principalement l'action léthale des cultures filtrées. Faisons observer en passant que la conception de Prigge sur l'activité relative des antigènes élaborés par *Welchia perfringens* concorde avec celle de Bull et Pritchett. Faisons remarquer aussi que l'antigène  $\zeta$  de Prigge correspond à l'antigène  $a$  de Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling et Ross. En effet, Ipsen, Llewellyn-Smith et Sordelli [39] ont signalé que des toxines peu hémolytiques préparées par Prigge produisent dans le derme une nécrose typique et insisté sur le fait que les déterminations de l'activité léthale et de l'action nécrosante d'un mélange de sérum et de toxine fournissent des résultats concordants : une unité antitoxique de sérum anti-*perfringens* neutralise



la même quantité de toxine d'après les titrages effectués par voies veineuse et intradermique.

Rappelons que l'on désigne par L+ le poids de toxine qui additionné d'une unité antitoxique de sérum étalon tue environ la moitié des souris de 17 à 20 g. auxquelles un tel mélange est injecté par voie veineuse ; on indique par LN le poids de toxine qui mélangé à une unité d'antitoxine *perfringens* provoque en injection intradermique (cobayes) une nécrose de 5 × 5 mm. Lorsqu'une toxine contient en prédominance l'antigène nécrosant  $\alpha$ , le rapport des doses LN et L+ est voisin de l'unité.

Après les travaux de Prigge, différents expérimentateurs de divers pays ont utilisé les lettres  $\alpha$  et  $\zeta$  pour désigner les deux antigènes caractéristiques de la toxine *perfringens* définis par cet auteur [57, 83, 18, 38, 12, 45, 48]. Des publications qui viennent d'être portées à notre connaissance [35 et 49] montrent que les auteurs anglais considèrent aussi à présent que la toxine *perfringens* A contient fréquemment deux antigènes essentiels, mais ces auteurs n'adhèrent pas à la nomenclature de Prigge. Dans les articles anglais, l'antigène léthal, nécrosant et hémolytique de la toxine *perfringens* est désigné par  $\alpha$  et la deuxième hémolysine par  $\theta$ . Cette hémolysine correspond à celle que Prigge a appelée  $\alpha$ . De l'ensemble de ces faits, il ressort donc que, suivant les auteurs, l'antigène nécrosant de la toxine *perfringens* est désigné par  $\alpha$  (depuis 1933) ou par  $\zeta$  (depuis 1936) ; l'hémolysine qui existe souvent en grande quantité dans les cultures *perfringens* est désignée par  $\alpha$  (depuis 1936, Prigge) ou par  $\theta$  (depuis 1941). Ces doubles dénominations sont évidemment fâcheuses. Comme il convient de conserver à  $\alpha$  la première attribution qui lui a été faite, nous désignerons par  $\alpha$ , dans l'exposé qui va suivre, l'antigène léthal et nécrosant étudié en 1933 par Glenney, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling et Ross [17] ; nous adopterons l'appellation  $\theta$  pour l'hémolysine élaborée en abondance par *Welchia perfringens*.

A partir de 1936, M. Weinberg et M. Guillaumie ont exposé les résultats de leurs recherches sur l'activité de la toxine *perfringens* A et leurs observations sur le dosage des sérums anti-A. En poursuivant ces recherches avec de nombreux échantillons de toxine préparés avec la souche Lechien dans du bouillon Vf glucosé à 1 p. 1.000 [78, 79, 20, 21], nous avons bien établi les faits suivants :

1° La dose-test L+ d'une toxine dépend souvent beaucoup du sérum étalon anti-A employé dans le dosage sur souris par voie veineuse (2) ; inversement, le titre antitoxique d'un même sérum

(2) Voici 3 exemples de résultats discordants et 3 exemples de résultats concordants [20] obtenus sur souris. a) Résultats discordants : le sérum étalon danois neutralise 1,3 mg. de toxine E<sub>33</sub> ; le sérum étalon français St<sub>3</sub> neutralise 0,75 mg. de cette toxine ; le premier étalon neutralise

anti-A peut varier *considérablement* avec l'échantillon de toxine A utilisé dans les titrages sur souris (3).

2° L'activité hémolytique des toxines et le titre anti-hémolytique des sérums étudiés n'expliquent pas la diversité des résultats sur souris.

Ces données ont permis de conclure que les toxines élaborées dans du bouillon Vf par la souche Lechien renferment en dehors de l'hémolysine  $\theta$  et de l'agent nécrosant  $\alpha$  des quantités importantes d'un autre antigène très nocif en injection intraveineuse ; Ipsen et Davoli [38] l'ont désigné par  $\eta$ . D'après ces auteurs, l'antigène  $\eta$  est dépourvu de propriétés hémolytiques et nécrosantes ; il n'apparaît pas dans le bouillon de Walbum et Reymann ensemencé avec la souche Lechien ou avec la souche SS. Guillau-

1,9 mg. de toxine  $E_{33}$  et le deuxième 1,3 mg. seulement ; l'étalon danois neutralise 1,7 mg. de toxine  $P_{24}$  et l'étalon  $St_3$  en neutralise 0,65 mg.

b) Résultats concordants : les 2 sérums étalons neutralisent l'un et l'autre, 1,2 mg. de toxine  $E_{31}$  ; 2,6 mg. de toxine  $E_{37}$  ; 1,5 mg. de toxine  $E_{40}$ . De ces résultats concordants nous n'avons pas conclu que les 2 étalons étaient identiques car les résultats discordants mentionnés ci-dessus indiquent incontestablement que les 2 étalons ne sont pas équivalents.

Au cours de recherches similaires effectuées en 1936-1938, nous avons constaté que l'activité de l'étalon  $St_1$  était comparable à celle de l'étalon danois vis-à-vis de certaines toxines,  $E_{13}$  et  $E_{18}$  par exemple, et ne l'était pas vis-à-vis des toxines  $E_3$ ,  $E_{11}$ ,  $E_{17}$ ,  $E_{19}$ . Nous avons conclu que les 2 sérums étalons étaient différents [79].

Les 3 sérums étalons étudiés sont anti-nécrosants et anti-hémolytiques, mais ils ne contiennent sûrement pas dans les mêmes proportions les anticorps correspondant aux antigènes des toxines complexes  $E_3$ ,  $E_{11}$ ,  $E_{17}$ ,  $E_{19}$ , d'une part,  $E_{33}$ ,  $E_{38}$ ,  $P_{24}$  d'autre part. Dès lors, une déduction pratique s'impose : pour déterminer si des sérums étalons sont identiques dans leurs propriétés essentielles, il est nécessaire de comparer simultanément leur action antitoxique *in vivo* et anti-hémolytique *in vitro* et d'utiliser pour cela les toxines de constitution simple préparées couramment (toxines contenant en prédominance l'antigène nécrosant  $\alpha$  ou l'hémolysine  $\theta$ ) et, en outre, des toxines complexes riches en antigène  $\eta$  tant qu'on ne disposera pas d'une toxine  $\eta$  pure. Il conviendrait en outre de préciser leur teneur en antiferments.

Rappelons que Hartley (1931), Prigge (1936-1937), Ipsen (1939) ont titré des sérums étalons en présence de toxines de composition simple, à facteur  $\alpha$  prédominant.

(3) Ces observations, en contradiction formelle avec les assertions formulées en 1931 sur le dosage des sérums anti-*perfringens* [33 a], ont suscité de nombreux contrôles : en 1938, Madsen a proposé, ainsi que le signalent Ipsen, Llewellyn-Smith et Sordelli [39], que le titrage de différents sérums et toxines soit entrepris dans divers laboratoires. Rappelons que Ipsen et Davoli [38] ont obtenu des résultats conformes aux nôtres au cours des titrages effectués avec plusieurs échantillons de toxine *perfringens* préparés avec la souche Lechien.

mie, Kreguer et Fabre ont ensuite fait les observations suivantes :

1° La souche danoise SS et la souche allemande A 100 P, de même que la souche française Lechien, sécrètent l'antigène  $\eta$  dans le bouillon Vf [28] : cet antigène est aussi élaboré par *W. perfringens* dans les digestions chlorhydropeptiques de foie ou de placenta [30].

2° Le précipité toxique riche en antigènes  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\eta$  obtenu en ajoutant du sulfate neutre d'ammonium aux cultures *perfringens* centrifugées est légèrement toxique après l'avoir chauffé, à pH 6, pendant cinq minutes à 70° mais il perd, à pH 6, toute activité biologique au cours d'un chauffage de cinq minutes dans un bain-marie à 100° ; à pH 7,6, la solution du précipité dans l'eau physiologique est encore toxique après quinze et trente minutes de chauffage à 100°, mais après soixante minutes à 100°, elle ne l'est plus (expériences avec une solution initiale à 100 D. M. par centimètre cube ; titrages sur souris, veines).

3° Dans le bouillon Vf additionné de fragments de foie cuit, la souche SS n'engendre en quantité importante que l'antigène nécrosant  $\alpha$  [27, 29].

Ainsi, suivant le milieu nutritif employé, une culture de *W. perfringens* peut contenir en quantité abondante l'antigène  $\alpha$  ou les antigènes  $\alpha$  et  $\theta$  ou bien les 3 antigènes spécifiques et thermolabiles  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ , en même temps que divers ferments que nous signalerons plus loin. Nous nous basons sur ces données lorsque nous préparons des toxines destinées au titrage des sérums anti-*perfringens* ou à l'immunisation des chevaux.

En 1937, l'une de nous écrivait avec M. Weinberg que les résultats du titrage d'un sérum anti-*perfringens* devraient indiquer le taux des divers anticorps du sérum, mais ajoutions-nous cela ne sera guère possible que lorsqu'on aura dissocié les constituants des toxines [78]. D'après les faits que nous venons de signaler, l'addition de fragments de foie au bouillon Vf nous permet d'inhiber la production des antigènes  $\eta$  et  $\theta$  et par suite d'obtenir des toxines à facteur  $\alpha$  dominant, utilisables pour la détermination du titre anti- $\alpha$  des sérums (titrages sur souris).

Précédemment nous avons étudié, d'une part, les variations de l'activité hémolytique des toxines complexes conservées dans différentes conditions, et, d'autre part, l'action du Ca et de divers réducteurs sur les toxines dont le pouvoir lytique avait baissé spontanément au cours de la conservation [31]. Les résultats obtenus ont montré que le Ca restaure intégralement l'effet hémolytique d'une partie seulement des toxines qui sont totalement activables par la cystéine. L'effet activateur du Ca est donc moins constant que celui de la cystéine. Ce fait montre que dans certaines conditions seulement le Ca peut rétablir l'activité de l'hémolysine  $\theta$  devenue inactive pendant le vieillissement. Dans une autre série



d'expériences nous avons mis en évidence que le Ca n'augmente pas non plus le titre hémolytique de toutes les toxines atténuées par la chaleur. Actuellement, le mécanisme de l'activation par le Ca reste indéterminé.

Au cours de nos recherches sur les propriétés hémolytiques des toxines *perfringens* complexes portées à différentes températures [31, 32, 33], nous avons examiné parallèlement les variations de l'activité léthale de ces toxines chauffées ; précisons ici que ces expériences ont été faites avec des toxines liquides centrifugées.

#### ACTION DE LA CHALEUR SUR LES TOXINES *perfringens* COMPLEXES.

Nous avons chauffé à différentes températures des toxines élaborées par les souches Lechien, SS ou A 100 P dans des bouillons Vf glucosés à 1 p. 1.000 ; nous avons utilisé des toxines centrifugées, préparées depuis un à trois jours ou depuis un à cinq mois. Nous avons aussi chauffé des toxines formolées à 2 p. 1.000 depuis deux et trois mois. Au cours des divers chauffages, les toxines centrifugées deviennent souvent plus ou moins opalescentes. Les titrages sont effectués *in vivo* et *in vitro*, avant et après chauffage ; nous exprimons en doses mortelles (D. M.) par centimètre cube l'action léthale des toxines déterminée sur souris de 17 à 20 g. (veines).

Rappelons brièvement les conditions expérimentales : les toxines, par quantités de 3,5 c. c., sont réparties dans des tubes en verre mince de 14 mm. de diamètre intérieur, puis plongées, pendant un nombre de minutes que nous indiquons au cours de l'exposé, dans des bains-marie à température constante. Les toxines atteignent rapidement la température du bain : ainsi, en soixante secondes, la toxine d'un tube immergé dans un bain-marie en ébullition s'élève à la température de 100°.

TOXINES FRAICHEMENT PRÉPARÉES. — 18 toxines (pH 6,8 à 7,1) sont portées à 60°, 12 à 70° et 32 à 100°. La plupart contiennent avant tout chauffage 30 à 60 D. M. et 1.000 à 3.000 D. H. par centimètre cube ; plusieurs renferment 90 à 120 D. M. par centimètre cube (tableau I). Après cinq minutes de chauffage dans un bain-marie à 60°, 11 toxines sur 18 ne tuent pas la souris à la dose de 0,5 c. c. ; 7 restent toxiques ; un chauffage de trente minutes à 60° supprime leur nocivité ; après cinq minutes dans un bain-marie à 70°, 6 de ces préparations ne sont plus toxiques, une contient 2 à 5 D. M. par centimètre cube. Après cinq minutes à 100°, 4 toxines sur 32 perdent leur nocivité, 28 sont mortelles pour la souris ; 4 contiennent alors 35 et 30 D. M. par centimètre cube, 2 contiennent 20 D. M., une, 15 ; 5 en renferment 10 et les autres 2 à 5 ou 5 à 10 par centimètre cube. Le calcul indique que l'activité de ces 28 toxines chauffées pendant cinq minutes dans un

bain-marie à 100° atteint 10 à 50 p. 100 de l'activité initiale. Rappelons que l'activité *in vitro* des toxines nocives *in vivo* après un tel chauffage ne dépasse pas dans nos expériences le titre de 30 D. H. par centimètre cube.

Nous avons chauffé 9 toxines pendant cinq, quinze et soixante minutes à 100°. Nocives après cinq minutes de chauffage, elles ne l'étaient plus après soixante minutes ; mais 6 étaient encore nocives après quinze minutes : elles contenaient, par centimètre cube, 2 à 5 D. M., et 3 titraient encore 2 D. M. par centimètre cube après trente minutes à 100°.

En confrontant l'action léthale des mêmes toxines, maintenues simultanément pendant cinq minutes dans des bains à 70 ou 100°, nous avons constaté que 11 toxines étaient nocives *in vivo* après chauffage à 100°, alors qu'elles ne l'étaient pas à la dose de 0,5 c. c. après chauffage à 70°. Nous en donnons les exemples dans le tableau I. Ainsi la toxine III du 9 août 1944, dont le titre avant tout chauffage est de 90 D. M. par centimètre cube, contient 35 D. M. après cinq minutes de séjour dans un bain-marie à 100° et ne tue pas les souris à la dose de 0,5 c. c. après cinq minutes à 70°.

TABLEAU I. — Action de la chaleur sur le titre léthal, exprimé en doses mortelles (D. M.) par centimètre cube, de différents échantillons de toxine *perfringens* fraîchement préparés.

TOXINE <i>perfringens</i>	TITRE de la toxine non chauffée / (D. M. par c. c.)	TITRE DE LA TOXINE chauffée pendant :		
		5 minutes dans un bain-marie à 70° (D. M. par c. c.)	5 minutes dans un bain-marie à 100° (D. M. par c. c.)	5 minutes à 70° et 5 minutes à 100° (D. M. par c. c.)
8 juillet 1943. . . . .	40		< 2	
19 octobre 1943. . . . .	30 à 40	< 2	2 à 5	
I du 4 janvier 1944. . . . .	20 à 30		2 à 5	
31 janvier 1944. . . . .	60	< 2	20	
1 <sup>er</sup> février 1944. . . . .	30 à 40	< 2	2 à 5	
A du 15 février 1944. . . . .	30		5 à 10	
C du 15 février 1944. . . . .	50		5 à 10	
I du 2 juin 1944. . . . .	50 à 60	< 2	10	5
II du 2 juin 1944. . . . .	40	< 2	10	
III du 2 juin 1944. . . . .	30	< 2	5	
C du 4 juillet 1944. . . . .	50		10	
II du 11 juillet 1944. . . . .	30		15	5
III du 11 juillet 1944. . . . .	50	< 2	20	10
III du 9 août 1944. . . . .	90	< 2	35	20
	120	< 2	35	
	100	< 2	30	
	90	< 2	5 à 10	

Après ajustage à pH 7,5, par addition de soude, 4 toxines se sont moins atténuées en cinq minutes à 100° qu'avant alcalinisation (souris, veines). Exemple : une toxine de pH 6,85 contient avant chauffage 50 D. M. par centimètre cube et après cinq minutes à 100° : 10 D. M. par centimètre cube ; après ajustage à pH 7.5 et chauffage à 100° pendant cinq minutes elle en contient 20.

Ces observations nous ont engagées à déterminer le pH des toxines après cinq minutes de chauffage dans des bains-marie à 70 ou 100°. Les résultats du tableau II indiquent que les toxines chauffées à 100° sont généralement plus alcalines que les toxines portées à 70°.

Les trois dernières toxines qui figurent dans le tableau II ne sont pas nocives pour la souris, à la dose de 0,5 c. c., après chauffage à 70° ; après chauffage à 100°, elles contiennent respectivement 10, 10 et 5 D. M. par centimètre cube : non hémolytiques après chauffage à 70°, elles contiennent 15 à 25 D. H. par centimètre cube après chauffage à 100°. Comme nos autres toxines léthales après un chauffage de cinq minutes à 100°, elles déterminent une réaction nécrotique en injection intradermique ; elles sont spécifiquement neutralisées par les sérums anti-*perfringens* employés à faible dose. Ces faits révèlent l'existence de l'antigène *nécrosant*  $\alpha$  dans ces toxines chauffées faiblement hémolytiques. Après avoir fait ces constatations nous avons mis en évidence que des toxines légèrement acides ou neutres avant le chauffage et qui perdent en cinq minutes à 70° leur action léthale ainsi que leurs propriétés hémolytique et nécrosante, redeviennent généralement nocives *in vivo*, hémotoxiques *in vitro* et dermo-nécrosantes, lorsqu'on leur fait ensuite subir un chauffage de cinq minutes dans un bain-marie à 100°.

TABLEAU II. — pH de différentes préparations de toxine *perfringens* avant et après chauffage, pendant cinq minutes, dans des bains-marie à la température de 70 ou 100°.

TOXINE <i>perfringens</i>	pH avant chauffage	pH après chauffage à 70°	pH après chauffage à 100°
C du 7 septembre 1944 . . .	6,89	6,93	6,95
V du 4 janvier 1944 . . . . .	7	7,05	7,1
I du 18 avril 1944 . . . . .	6,85	7	7,15
I du 2 juin 1944 . . . . .	7,05	7,05	7,40
II du 2 juin 1944 . . . . .	7	7,15	7,35
III du 2 juin 1944 . . . . .	7,05	7,05	7,05

Exemple : Titre de la toxine I du 2 juin 1944 aussitôt après la préparation : 50 à 60 D. M. et 2.500 D. H. par centimètre cube ; après cinq



minutes dans un bain-marie à 70° : l'action léthale, hémolytique et dermo-nécrosante a disparu ; après cinq minutes dans un bain-marie à 100°, la toxine contient 10 D. M. et 14 D. H. par centimètre cube et détermine une forte nécrose dermique à la dose de 0,1 c. c. ; après un chauffage de cinq minutes dans un bain-marie à 70° suivi d'un chauffage de cinq minutes dans un bain-marie à 100°, la toxine contient 5 D. M., 14 D. H. par centimètre cube et produit une réaction dermo-nécrotique nette à la dose de 0,2 c. c.

Après avoir constaté que les toxines perdent leur nocivité en cinq minutes à 70°, nous avons recherché si l'action léthale des toxines maintenues pendant cinq minutes dans un bain-marie à 100° serait totalement annulée au cours d'un chauffage consécutif de cinq minutes à 70°. Tel n'a pas été le cas au cours des deux essais que nous avons réalisés ; la nocivité a été diminuée mais non supprimée. Voici un exemple : Avant le chauffage, la toxine contient 100 D. M. par centimètre cube ; après cinq minutes à 70° elle ne tue pas à la dose de 0,5 c. c. Après cinq minutes à 100°, elle contient 20 D. M. par centimètre cube ; après deux chauffages, le premier à 100° et le deuxième à 70°, la toxine contient 5 à 10 D. M. par centimètre cube.

En poursuivant nos investigations, il nous a été donné de titrer 2 toxines très dermo-nécrosantes après cinq minutes à 100° et possédant, après ce chauffage, l'une 15 D. M. par centimètre cube et l'autre 20 ; en injection intradermique au cobaye, elles ont provoqué, à la dose de 0,05 c. c., une nécrose de 5×5 mm. environ ; d'après les dosages *in vitro*, en présence d'eau physiologique, *elles ne contenaient que 1 et 5 D. H. par centimètre cube* ; la cystéine ou le calcium n'ont pas sensiblement renforcé cette activité minime. Une autre toxine contenait, par centimètre cube, après cinq minutes dans un bain-marie à 100°, 6 D. H. et 10 D. M. ; elle était très dermo-nécrosante. Ces faits incitent à penser, d'une part, que l'antigène nécrosant  $\alpha$  des toxines chauffées à 100° n'est pas hémotoxique ou l'est très peu, et, d'autre part, que l'hémolysine  $\theta$  doit exister dans les toxines nettement hémolytiques après chauffage à 100°. Si de nouveaux résultats étayaient ces hypothèses, il y aura lieu de rechercher si l'antigène  $\alpha$  des toxines non chauffées exerce vraiment un effet hémotoxique *in vitro*, et si la faible action hémolytique qui lui est attribuée actuellement [39, 12] n'est pas due à de petites quantités d'hémolysine  $\theta$ .

TOXINES PRÉPARÉES DEPUIS UN A CINQ MOIS. — Titrage *in vivo* de 25 toxines dont le pH varie entre 7,2 et 7,5. *Le chauffage les atténue moins que les toxines fraîchement préparées.* Sauf dans deux cas, les toxines chauffées dans des bains-marie à 60 ou 70° pendant cinq minutes sont moins nocives que les mêmes toxines chauffées pendant cinq minutes dans un bain-marie à 100°. L'examen du tableau III dans lequel nous indiquons le titre de

15 toxines maintenues, un à cinq mois après leur préparation, pendant cinq minutes dans des bains-marie à différentes températures, permet de constater que 10 toxines après cinq minutes à 70° contiennent 2 à 15 D. M. par centimètre cube et de se rendre nettement compte que 8 toxines sont moins nocives après ce chauffage à 70° qu'après le chauffage à 100°.

TABLEAU III. — Action de la chaleur sur le titre léthal, exprimé en D. M. par centimètre cube, de différents échantillons de toxine *perfringens* préparés depuis un certain temps.

TOXINE <i>perfringens</i>	TITRE de la toxine fraîchement préparée (D. M. par c.c.)	TOXINES PRÉPARÉES DEPUIS 1 A 5 MOIS; titre léthal déterminé :				
		Avant le chauffage (D. M. par c.c.)	Après chauffage pendant 5 minutes dans des bains-marie à la température de :			
			60° (D. M. par c.c.)	70° (D. M. par c.c.)	80° (D. M. par c.c.)	100° (D. M. par c.c.)
8 juillet 1943 . . . . .	40	<2				2 à 5
B du 7 septembre 1943.	50-60	15				5 à 10
C du 7 septembre 1943	40	20	10	10 à 15		15 à 20
A du 14 septembre 1943.	30	15		2		10
C du 14 septembre 1943.	20-30	10-15	5	2 à 5	2 à 5	5 à 10
II du 14 septembre 1943.	30	20		5 à 10		10
D du 21 septembre 1943.	20-30	15	<2	2	2 à 5	<2
B du 9 octobre 1943 . . .	20-30	<2	<2		<2	5 à 10
I du 4 janvier 1944. . . .	20-30	10-15				10 à 15
4 <sup>e</sup> février 1944. . . . .	30-40	10-15		5		10
A du 15 février 1944. . .	30	20-30				10 à 15
I du 2 juin 1944 . . . . .	50 60			10		
III du 2 juin 1944 . . . .	30			5		8
C du 4 juillet 1944. . . .	50			2 à 5		10
D du 4 juillet 1944. . . .	20-30			5		10

Huit toxines préparées depuis plusieurs mois, contenant alors 15 ou 20 D. M. et 25 à 140 D. H. par centimètre cube, sont chauffées pendant cinq minutes à 100° et titrées *in vitro* après avoir déterminé leur titre *in vivo*. Le chauffage diminue leur action léthale et leur activité hémolytique. Les déterminations montrent, qu'après le chauffage, l'une des toxines contient 100 D. H. et 10 D. M., une autre 20 D. H. et 15 D. M. et deux autres : 5 D. H. et 10 D. M. par centimètre cube. Rappelons qu'en présence de cystéine (1 pour 1.000), ces toxines chauffées titrent respectivement 100, 20, 110 et 140 D. H. par centimètre cube ; la cystéine accentue donc l'activité hémolytique des deux dernières et ne modifie pas celle des deux premières ; avant le chauffage, la deuxième contenait 20 D. M. et 50 D. H. par centimètre cube en l'absence de cystéine et 2.000 D. H. après activation par la cystéine.

En recherchant l'action sur le derme des toxines chauffées contenant 5 D. H. par centimètre cube et 10 D. M. avant addition de cystéine, nous avons observé qu'elles produisaient une forte nécrose. Ces toxines chauffées pendant cinq minutes à 100° longtemps après leur préparation contiennent donc l'antigène nécrosant  $\alpha$  tout comme les toxines ayant subi la même élévation de température aussitôt après leur préparation.

En acidifiant, avant le chauffage, 4 toxines préparées depuis trois mois, nous avons augmenté leur labilité à 100° ; ce fait, ainsi que le phénomène contraire que nous avons observé après alcalinisation de 4 toxines fraîchement préparées, montre que le pH affecte la thermorésistance des toxines ; mais le pH n'est que l'un des facteurs qui conditionne l'activité d'une toxine donnée, soumise au chauffage. Les observations suivantes révèlent que des changements, dont la nature est à préciser, se produisent au sein des toxines pendant le vieillissement et que ces changements influencent appréciablement l'activité des toxines chauffées ; voici ces observations : a) une toxine préparée depuis deux mois, dont le pH est resté constant et égal à 6 pendant la conservation, est moins atténuée par le chauffage à 100° pendant cinq minutes qu'aussitôt après sa préparation (titrages sur souris, veines) ; b) aussitôt après sa préparation, une autre toxine (pH 7) contient 40 D. M. par centimètre cube et après cinq minutes de chauffage dans un bain-marie à 70° *elle n'est plus nocive in vivo* à la dose de 0,5 c. c. Après quarante-cinq jours de conservation à 2°, le pH de la toxine non chauffée est de 7,6 et elle titre 20 D. M. par centimètre cube ; cette toxine est alors chauffée pendant cinq minutes à 70°, soit à pH 7,6, soit après ajustage à pH 7 ; dans l'un et l'autre cas, elle est très nocive après ce chauffage puisqu'elle titre alors entre 10 et 15 D. M. par centimètre cube. Ce résultat montre nettement qu'en dehors de la variation de pH signalée et de la transformation partielle des antigènes en toxoïdes, d'autres changements ont eu lieu pendant la conservation de la toxine. Il est possible que les antigènes léthaux subissent pendant la conservation des modifications physico-chimiques qui augmentent leur résistance au chauffage. Il est possible aussi que les toxines fraîchement préparées contiennent des substances inhibitrices qui masquent l'action de petites quantités d'antigènes léthaux et que pendant le vieillissement ces substances s'atténuent progressivement, comme c'est le cas pour les divers antigènes présents dans les toxines. Si l'on admet l'existence des substances inhibitrices et leur diminution progressive, les toxines préparées depuis un certain temps contiendront moins de ces substances que les toxines fraîchement préparées ; cette hypothèse permettra alors d'interpréter en partie le fait que les toxines chauffées après conservation sont plus nocives que les toxines chauffées aussitôt après la préparation.



Nous avons signalé précédemment que le chauffage à 100° modifie plus ou moins le titre et le pH des toxines portées pendant cinq minutes dans un bain-marie à cette température : un tel chauffage diminue l'intensité des propriétés hémolytiques et léthales des toxines, et, ainsi que nous le verrons plus loin, il affaiblit l'activité enzymatique ; il produit vraisemblablement d'autres changements. Au cours de nos investigations sur la thermorésistance de la toxine *perfringens* centrifugée, nous avons, en effet noté le fait intéressant suivant : une toxine contenant 20 à 30 D. M. par centimètre cube aussitôt après sa préparation est conservée à 2° pendant un mois; au bout de ce temps elle n'est plus nocive pour la souris à la dose de 0,5 c. c. et elle n'est pas dermo-nécrosante ; elle est alors chauffée pendant cinq minutes dans un bain-marie à 100° et l'on constate que cette toxine, portée à l'ébullition et refroidie, tue les souris non seulement à la dose de 0,5 c. c. mais aussi à la dose de 0,2 c. c. ; en injection intradermique, elle provoque une réaction nécrotique ; elle est neutralisée par les sérums anti-*perfringens*. Le chauffage à 100° a donc régénéré les propriétés caractéristiques de cette toxine. Cette observation est à rapprocher de celles que nous avons faites, d'une part, lorsque nous avons comparé le titre léthal des toxines chauffées à 70° et 100°, d'autre part, lorsque nous avons porté pendant cinq minutes à 100° des toxines déjà chauffées à 70°. Rappelons ce dernier fait : des toxines fraîchement préparées, qui viennent d'être dépouillées de leur activité léthale, hémolytique et nécrosante par un chauffage de cinq minutes dans un bain-marie à 70° récupèrent ces diverses activités pendant un chauffage consécutif de cinq minutes dans un bain-marie à 100°. Quelle est la nature des transformations subies par la toxine à la température d'ébullition? Actuellement, nous ne pouvons que formuler des hypothèses à ce sujet. Le chauffage à 100° supprime peut-être des substances qui inhibaient l'action léthale des principes nocifs de la toxine *perfringens* ou peut-être libère des toxines à partir d'une prétoxine ou d'un toxoïde présents dans le liquide soumis au chauffage. Quoi qu'il en soit, le double phénomène que nous signalons — labilité des antigènes de la toxine *perfringens* maintenue pendant cinq minutes dans un bain-marie à la température de 70°, régénération partielle des mêmes antigènes, en cinq minutes, à la température de 100° — est à mettre en parallèle avec les résultats notés par Durieux [45] au cours de ses recherches sur la sucrase de la levure. Cet auteur a signalé que la sucrase de la levure, diastase thermolabile, est thermostable dans certaines circonstances.

Gabriel Bertrand et M. Rosenblatt, après avoir contrôlé les résultats de Durieux et désigné le phénomène sous le nom de thermorégénération des diastases [6] ont recherché si d'autres

enzymes se comportaient comme la sucrase. Mais en expérimentant avec la laccase et la maltase de la levure, ces auteurs [7] ont constaté que ces deux diastases n'étaient pas régénérées aux températures de 90 ou 100° après avoir été détruites par une minute de chauffage à 60, 65 ou 70°. De sorte que le phénomène de la thermorégénération de la sucrase n'apparaissait pas généralisable. Nos résultats sur la thermorégénération des antigènes de la toxine *perfringens* centrifugée n'en sont que plus frappants.

**TOXINES FORMOLÉES.** — Deux et trois mois après addition de 2 p. 1.000 de formol, les 5 toxines étudiées contiennent 2 à 10 D. M. et 15 à 20 D. H. par centimètre cube. Elles sont dermo-nécrosantes et neutralisables par les sérums anti-*perfringens*. Après cinq minutes dans un bain-marie à 100°, 2 préparations perdent toute nocivité, 3 contiennent encore 2 D. M. par centimètre cube.

**TOXINES FILTRÉES.** — La filtration sur bougie Chamberland modifie la thermo-stabilité de la toxine *perfringens*. Cette donnée est tirée de l'observation suivante : deux préparations de toxine *perfringens* centrifugées sont chauffées telles qu'elles et après filtration sur bougie L3. Les échantillons de toxine centrifugée perdent toute nocivité en cinq minutes à 70° ; par contre, les 2 échantillons de toxine filtrée contiennent respectivement 10 et 20 D. M. par centimètre cube après cinq minutes à 70°. Avant tout chauffage, la première de ces toxines contenait : 100 D. M. par centimètre cube aussitôt après la centrifugation et 50 D. M. après filtration. La filtration a donc considérablement diminué la nocivité de cette toxine et complètement modifié son comportement vis-à-vis de la chaleur. Fait intéressant à signaler, la filtration n'a pas modifié le titre lécithinasique de cette toxine ; s'il est exact que l'effet lécithinasique est produit par l'antigène  $\alpha$  on peut dès lors penser, pour expliquer la faiblesse du titre léthal de la toxine filtrée, que la filtration sur bougie L3 a considérablement diminué la teneur en antigène  $\gamma$  de la toxine examinée, puis supposer que l'antigène  $\gamma$  influence la thermorésistance des toxines à 70°.

En résumé, si l'on soumet à l'action de la chaleur des toxines *perfringens* centrifugées, fraîchement préparées, de pH 6,8 à 7,1, on constate qu'elles ne sont généralement pas nocives pour la souris, à la dose de 0,5 c. c., après avoir séjourné pendant cinq minutes dans un bain-marie à 70° et qu'elles ne sont plus hémolytiques après une telle élévation de température ; par contre, elles contiennent, après cinq minutes de chauffage dans un bain-marie à 100°, 2 à 35 D. M. et, en général, 3 à 30 D. H. par centimètre cube (4). Les

(4) Nous avons étudié l'action de la chaleur sur 8 échantillons de toxine vibron septique, pH 5,3 ou 5,4, contenant 100 à 300 D. M. par centimètre cube (souris, veines), sur 6 échantillons de toxine histolytique, pH 7,1 à 7,4, titrant 100 à 200 D. M. par centimètre cube

toxines préparées depuis un ou plusieurs mois sont moins thermolabiles que les toxines fraîchement préparées ; les variations de pH qui se produisent généralement pendant la conservation conditionnent en partie ce phénomène ; mais, pendant le vieillissement, les toxines subissent d'autres transformations que celles enregistrées par les déterminations du pH, de l'action léthale et des propriétés hémolytiques et nécrosantes ; ces transformations de nature encore indéterminée influencent aussi le titre des toxines soumises au chauffage. Les toxines formolées à 2 p. 1.000 depuis quelques mois sont fréquemment nocives après cinq minutes de chauffage à 100°. La filtration sur bougie influence aussi la thermostabilité de la toxine *perfringens*.

Les toxines nocives *in vivo* après chauffage à 100° contiennent l'antigène dermonécrosant  $\alpha$  ; après avoir observé ce fait, nous avons fait agir de telles toxines sur du sérum humain et examiné comparativement l'effet des toxines chauffées à 70°. Nous exposons nos résultats dans le chapitre suivant réservé à l'étude de l'activité enzymatique de la toxine *perfringens*.

#### Activité enzymatique de la toxine *perfringens* A.

*Welchia perfringens* élabore, au cours de son développement, de multiples ferments dont l'action est inhibée par les sérums anti-*perfringens*. Nous allons examiner brièvement les propriétés protéolytiques de la toxine *perfringens* ; l'action destructive des cultures sur les substances spécifiques des groupes sanguins (ferment anti-groupal) ; l'effet perméabilisant de la toxine

(souris, veines) et sur 5 toxines œdématisans, pH 7,3 à 7,6, dont le titre variait entre 12.000 et 20.000 D. M. par centimètre cube (souris, injections sous-cutanées).

Les toxines du vibron septique ont été chauffées telles quelles ou après addition de soude. Chauffées telles quelles, elles ont toutes perdu leur nocivité en cinq minutes à 100° ; chauffées pendant cinq minutes à 100° après les avoir additionnées de soude pour les amener à pH 6,9, 7 ou 7,1, elles ne sont pas toutes détruites ; en effet, après ce chauffage, 4 ne sont plus nocives, mais 4 contiennent encore 2 à 5 D. M. par centimètre cube. En milieu neutre ou voisin de la neutralité, la toxine vibron septique est donc moins thermolabile qu'en réaction franchement acide.

Les toxines du *Cl. histolyticum* ont été chauffées telles quelles : 3 ont perdu leur nocivité en cinq minutes à 100° ; 2 ont titré 2 à 5 D. M. et une toxine 2 D. M. par centimètre cube après un tel chauffage. Après cinq minutes à la température de 70°, elles n'étaient pas nocives à la dose de 0,5 c. c.

Les 5 toxines œdématisans ont été chauffées telles quelles : leur nocivité a été abolie en cinq minutes à 70° ; après cinq minutes de chauffage à 100°, 4 ont été détruites, une contenait encore 2 à 5 D. M. par centimètre cube.



sur les tissus (facteur de diffusion) ; les transformations produites par la toxine dans le sérum humain et dans les solutions limpides de jaune d'œuf ou de lécithine.

#### I. — ACTION PROTÉOLYTIQUE.

Dès 1902, Tissier et Martelly [70] ont signalé que *W. perfringens* est un agent protéolytique. Dernby et Blanc [43], Stahly et Werkman [67], Walbum et Reymann [72 et 73], Mc Gaughey [50], Meisel [53] ainsi que Weil, Kocholaty et Smith [75] ont examiné l'action liquéfiante exercée sur la gélatine par les filtrats des cultures de *Welchia perfringens*. D'après Maschmann, ces cultures contiennent deux protéinases et des anaéropeptidases [51].

M. Guillaumie [25] a constaté, en comparant les volumes de sérum anti-*perfringens* utilisés pour empêcher l'effet gélatinolytique de quantités différentes de toxine *perfringens* (0,36 et 1,8 mg. de toxine E<sub>27</sub>), que la neutralisation d'une quantité élevée de toxine exige une dose de sérum plus grande que ne l'indique la loi des proportions multiples.

Grassmann [49], Maschmann [51], Smith [64] ont noté que les sérums normaux n'empêchent pas l'effet de la toxine *perfringens* sur la gélatine ; M. Guillaumie [23] a titré quelques sérums normaux de cheval exerçant une légère action empêchante, mais les titrages sur souris ont révélé la présence d'antitoxine *perfringens* dans ces sérums. G. Ramon [59] a signalé récemment que les sérums normaux des bovidés inhibent la gélatinase *perfringens*. Les sérums anti-A (5) sont nettement anti-gélatinolytiques. D'après M. Guillaumie [22, 23], les sérums anti-sporogènes et anti-œdématisiens ne contiennent qu'à l'état de traces les anti-protéinases caractéristiques des sérums anti-*perfringens* ; vis-à-vis de la toxine *perfringens* l'activité anti-gélatinolytique des sérums anti-histolytiques (6) riches en anti-protéases spécifiques est en général beaucoup plus faible que celle de la majorité des sérums anti-*perfringens*. L'action anti-protéolytique des sérums anti-*perfringens* peut être moins intense que l'activité anti-nécrosante évaluée sur lapins (derme). M. Guillaumie en a donné deux exemples [21].

M. Guillaumie [21] a comparé l'action gélatinolytique de 4 échantillons de toxine A en prenant comme dose d'épreuve de chacun d'eux le poids L + de toxine qui est neutralisé par une unité antitoxique du sérum étalon international ; ultérieurement nous avons examiné 29 échantillons de toxine précipitée par le sulfate neutre d'ammonium : 15 de ces échantillons

(5) Sérums de chevaux immunisés par des injections d'antigènes élaborés par la même souche de *W. perfringens* (souche Lechien) ; avant l'injection, ces antigènes ont été formolés à 5 p. 1.000, maintenus pendant sept jours dans une étuve à 38°, puis à la température du laboratoire.

(6) Sérums préparés par injection d'anatoxine histolytique (toxine formolée à 5 p. 1.000).

ont été préparés avec la souche Lechien, 7 avec la souche SS et 7 avec la souche A 100 P ; 7 toxines de la souche SS et 2 de la souche A 100 P ne contenaient pas ou très peu d'antigène  $\gamma$  ; toutes les autres toxines utilisées renfermaient en proportions variables les antigènes  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\gamma$ . Nous avons évalué par la méthode au formol de Sørensen l'intensité des transformations subies en six heures à 38° par 2 c. c. de gélatine à 3,5 p. 100 additionnés d'une dose-test de toxine (expériences à pH 6,85, 6,9, et 7,1 en milieu non tamponné). Les quantités de soude N/10 employées pour neutraliser les carboxyles des acides aminés formoltitrables ont varié entre 0,30 et 0,55 c. c. dans les expériences avec les toxines des souches Lechien ou SS et entre 0,30 et 0,43 dans les essais avec les toxines de la souche A 100 P. Il suffit de multiplier ces volumes de soude N/10 par 1,4 pour exprimer les résultats en milligramme d'N aminé. La comparaison des chiffres que nous avons obtenus montre que, dans les conditions des expériences, des toxines qui diffèrent par les quantités relatives des antigènes  $\alpha$ ,  $\theta$  et  $\gamma$  qu'elles contiennent, ont fréquemment la même activité enzymatique et que des toxines de formule antigénique comparable (LN : L+) diffèrent souvent par l'activité enzymatique.

Dans un certain nombre de titrages nous avons utilisé la méthode de Van Slyke à la place de celle de Sørensen pour évaluer l'intensité de la protéolyse produite par une dose-test de différentes toxines *perfringens* précipitées. Les résultats de ces dosages ont aussi montré que des toxines de même formule antigénique n'avaient pas la même activité gélatinolytique.

D'après nos recherches, la toxine *perfringens* après cinq minutes de chauffage à 70° ne possède plus la propriété, même à la dose de 1 c. c., de liquéfier la gélatine ; par contre, la toxine chauffée pendant le même temps à 100° exerce souvent une légère action liquéfiant [32]. Toutefois, un chauffage de cinq minutes à 100° effectué après un chauffage de cinq minutes à 70° ne régénère pas l'action gélatinolytique de la toxine *perfringens* (7).

(7) Nous avons soumis à l'action de la chaleur 5 échantillons de toxine histolytique préparés dans du bouillon VI. Avant et après chauffage, des doses décroissantes de toxine filtrée sont ajoutées à 2 c. c. de gélatine à 3,5 p. 100. Les mélanges sont ensuite placés pendant quatre heures dans une étuve à 38° puis dans de l'eau glacée. Ces investigations ont donné les résultats suivants : 1° cinq minutes de chauffage à 70° abolissent les propriétés gélatinolytiques des 5 toxines examinées ; 2° après cinq minutes de chauffage à 100°, les 5 toxines sont légèrement gélatinolytiques ; 3° après un chauffage de cinq minutes à 100°, consécutif à un chauffage de cinq minutes à 70°, 2 toxines manifestent un très léger pouvoir gélatinolytique. Avant tout chauffage, les 5 échantillons de toxine histolytique utilisés au cours de ces essais étaient nettement plus protéolytiques que les toxines *perfringens* non chauffées examinées ci-dessus.

L'ensemblé de ces expériences a été réalisé ainsi : dans une série de tubes contenant 2 c. c. de gélatine à 3,5 p. 100, pH 7,3, nous avons ajouté des quantités décroissantes de toxine chauffée aux températures précédemment mentionnées ; nous avons mis les mélanges dans une étuve à 38° ; vingt-quatre heures plus tard nous les avons immergés pendant trente minutes dans de l'eau froide (8-10°) ; puis nous avons regardé si certains d'entre eux restaient liquides ; lorsque tel était le cas, la toxine chauffée avait exercé une action gélatinolytique aux doses inscrites sur les tubes. (Expériences avec des toxines *perfringens* filtrées sur bougie L3.)

## II. — FERMENT ANTI-GROUPAL.

D'après Schiff [60], les cultures de *Welchia perfringens*, de *Bacillus L. D.* et *D.* contiennent un ferment qui a la propriété de détruire les éléments groupaux spécifiques A et B ; Kostuch [46] confirme ce fait et signale qu'en présence de sérum anti-*perfringens* provenant de chevaux immunisés par injections d'anaculture de *Welchia perfringens*, les cultures de ce bacille ne décomposent pas l'élément groupal. Le sérum a donc inhibé les propriétés destructives de ces cultures au point de vue que nous envisageons ici. D'après Schiff, le ferment en cause traverse les filtres Seitz, d'après Kostuch il ne traverse pas les bougies Chamberland.

## III. — FACTEUR DE DIFFUSION.

La toxine filtrée de *Welchia perfringens* contient en quantité abondante un ferment qui augmente la perméabilité des tissus (Mc Clean). Ce ferment, souvent désigné sous le nom de facteur de diffusion de Reynals [14], correspond à une mucinase qui dégrade l'acide hyaluronique présent dans certains mucus. Behring [2] a signalé que ce facteur est détruit en trente minutes à 70°.

D'après Mc Clean [47] le sérum anti-*perfringens* contient un anticorps capable de neutraliser le facteur de diffusion des cultures filtrées de *Welchia perfringens*.

## IV. — LÉCITHINASE.

Seiffert (1939) a montré que les filtrats *perfringens* possèdent la propriété de produire un trouble dans le sérum humain [62]. Presque simultanément, et indépendamment, Nagler a constaté le même phénomène : cet auteur a montré, d'une part, que *Welchia perfringens* en se développant dans le sérum humain détermine une opalescence et, d'autre part, que la toxine ajoutée au sérum produit aussi l'opalescence ; cette réaction est spécifiquement inhibée par le sérum anti-*perfringens* et peut servir, d'après Nagler, de méthode de titrage de la toxine de *Welchia perfringens* ainsi que de méthode de titrage des immunsérums correspondants [54].

Behring (1941) a signalé que l'agent responsable de la réaction de Seiffert apparaît rapidement dans les cultures et que les filtrats *perfringens* après dix minutes à 65° ou après cinq minutes de chauffage à 100°



possèdent encore la propriété de rendre le sérum humain trouble [3]. Il est établi aussi que tous les sérums humains ne donnent pas une réaction positive et que les sérums à réaction positive peuvent appartenir à l'un quelconque des 4 groupes sanguins.

Mc Farlane et Knight [49] ont démontré que la toxine *perfringens* ajoutée à une émulsion limpide de jaune d'œuf donne une opalescence et finalement une crème due à la coalescence des globules de graisse. Ces auteurs attribuent la réaction à une lécithinase et montrent qu'elle est inhibée par l'antitoxine  $\alpha$ . D'après les mêmes auteurs, la lécithinase est responsable de la réaction observée avec le sérum humain. Les résultats du titrage des sérums anti-*perfringens* par les méthodes *in vitro* au jaune d'œuf ou à la lécithine ayant montré une concordance satisfaisante avec ceux des dosages *in vivo* sur souris, les deux tests *in vitro* sont considérés comme propres à mesurer l'antitoxine  $\alpha$ . Mac Farlane et Knight estiment que les faits permettent de croire à l'identité probable de la lécithinase et de l'antigène léthal et nécrosant  $\alpha$  de la toxine *perfringens*, mais ajoutent toutefois que la preuve formelle dépend de l'isolement d'une substance ayant les propriétés requises.

Après chauffage de la toxine *perfringens* à pH 7,6, pendant dix minutes à 100°, il reste encore 45 p. 100 de l'activité lécithinasique (Mc Farlane et Knight, 1941).

Heyningen [34] a utilisé la méthode au jaune d'œuf pour déterminer l'activité des toxines préparées avec une même souche de *W. perfringens*. Après avoir décrit sa technique et insisté sur les résultats satisfaisants qu'elle permet d'obtenir rapidement, l'auteur note qu'il n'a pas encore trouvé des conditions d'estimation sûre de l'antitoxine *perfringens*. Il annonce que Crook, poursuivant ces recherches, a étudié la toxicité de 40 cultures filtrées préparées avec 14 souches de *W. perfringens* et examiné leur action sur le sérum humain et sur les solutions de jaune d'œuf (travail en publication).

Nous avons fait agir, comparativement, 12 toxines *perfringens* précipitées par le sulfate d'ammonium sur 9 échantillons de sérum humain des groupes A, B et O. Nous remercions vivement M. Kossovitch d'avoir eu l'amabilité de mettre à notre disposition des quantités suffisantes de ces sérums. Cinq toxines ne renfermaient pas de quantités appréciables d'antigène  $\eta$ , les autres en contenaient des proportions variables ainsi qu'on peut s'en rendre compte en examinant dans le tableau IV la valeur du rapport des doses LN et L + de 11 toxines en expérience. Dans le même tableau, nous notons la souche qui a servi à préparer ces toxines ainsi que leurs caractéristiques : la valeur de leur dose minima mortelle, D. M., vis-à-vis de la souris et la valeur de la dose nécrosante, D. N., qui produit sur la peau épilée des cobayes blancs une nécrose de 5 x 5 mm. Nous indiquons en outre dans le tableau IV la dose D. L. de chaque toxine qui produit une opalescence appréciable dans 0,2 c. c. des sérums humains employés, préalablement chauffés pendant une heure à 56° ; pour déterminer cette dose minima lécithinolytique, la toxine est dissoute dans de l'eau phy-

siologique, puis répartie par quantités décroissantes dans des tubes étroits (5,5 mm. de diamètre intérieur), dans lesquels on ajoute 0,2 c. c. de sérum humain chauffé et de l'eau physiologique pour que le volume final soit de 0,3 c. c. Les tubes contenant les mélanges de toxine et de sérum sont mis dans un excicateur et, après avoir fait le vide, placés dans une étuve à 37° ; ils sont examinés seize à dix-huit heures plus tard : le tube qui contient la plus petite quantité de toxine produisant une opalescence appréciable indique la dose D. L. recherchée.

TABLEAU IV. — Dose mortelle (D. M.), dose nécrosante (D. N.) et dose lécithinolytique (D. L.) de différentes toxines *perfringens* précipitées par le sulfate neutre d'ammonium.

D. M. et D. N. de différentes toxines Rapport des doses L. N. et L. + de ces toxines					D. L. de différentes toxines. Titrages avec le sérum humain			RAPPORT des doses D. L. et D. N. (D. L. déterminée avec le sérum n° 5)
Numéro de la toxine	Toxine élaborée par la souche :	D. M. (en mg.)	D. N. (en mg.)	Rapport LN/L +	N° 2 (en mg.)	N° 3 (en mg.)	N° 5 (en mg.)	
E <sub>40</sub>	Lechien	0,08	0,05	9	0,064			
E <sub>31</sub>	Lechien	0,065	0,031	8	0,039	0,019	0,032	1,05
E <sub>24</sub>	Lechien	0,055	0,015	4,6	0,022	0,041		
EP <sub>6</sub>	A <sub>100</sub> P	0,24	0,095	4,2	0,096	0,072	0,108	1,1
P <sub>25</sub>	Lechien	0,06	0,008	3,2	0,021		0,022	2,7
ES <sub>7</sub>	SS	0,063	0,02	3			0,055	2,7
ES <sub>3</sub>	SS	0,20	0,05	4,2				
EP <sub>5</sub>	A <sub>100</sub> P	0,12	0,026	4,1			0,033	1,2
ES <sub>5</sub>	SS	0,16	0,075	4,2			0,053	0,74
ES <sub>6</sub>	SS	0,08	0,014	4,1		0,016	0,020	1,4
ES <sub>10</sub>	SS	0,07	0,022	4,3			0,044	2

La valeur de la dose minima lécithinasique, D. L., d'une toxine varie plus ou moins avec le sérum. Ainsi il a fallu 0,013 mg. de la toxine E<sub>34</sub> pour rendre trouble le premier sérum du groupe A que nous avons utilisé ; il a fallu 0,022 mg. de cette toxine pour produire la même opalescence dans un deuxième sérum du même groupe et 0,011 mg. seulement en présence d'un troisième sérum du groupe A. Suivant que nous avons utilisé le deuxième ou le troisième sérum, il a fallu 0,096 ou 0,072 mg. de la toxine EP<sub>6</sub> pour déterminer la même opalescence. Nous avons fait la même constatation avec les autres toxines. Signalons aussi qu'elles ont toutes fourni une réaction positive avec les sérums des groupes B et O que nous avons mis en œuvre.

Après avoir déterminé la dose D. L. de toutes les toxines, nous avons calculé les rapports D. L. : D. M. et D. L. : D. N. Le pre-

mier de ces rapports varie, dans nos expériences, entre 0,8 et 0,17 ; il est inférieur à 1 quels que soient les sérums humains et les toxines utilisés, ce qui montre qu'il ne faut qu'une fraction de dose mortelle de toxine pour produire une opalescence dans les sérums humains. La valeur du rapport D. L. : D. N. pour une toxine donnée est tantôt supérieure, tantôt inférieure à l'unité, suivant le sérum employé. Examinons à présent les résultats obtenus avec différentes toxines additionnées du même sérum. Comparons, par exemple, les toxines  $EP_6$  et  $EP_5$  de formule antigénique très différente ; on constate, dans les titrages avec le cinquième sérum, que le rapport D. L. : D. N. dans le cas de la toxine  $EP_6$  est égal à 1,1 et qu'il est égal à 1,2 dans le cas de la toxine  $EP_5$ . Ces résultats concordants incitent à penser que l'antigène  $\eta$  n'influence pas la réaction de Seiffert. Nous verrons plus loin que cette opinion est corroborée par les résultats que nous avons obtenus en déterminant la quantité de sérum anti-*perfringens* qui inhibe l'action sur le sérum humain des toxines plus ou moins riches en antigène  $\eta$ . Pour faciliter la rédaction, nous désignerons sous le nom d'activité anti-lécithinasique cette propriété que possèdent les sérums anti-*perfringens* d'empêcher l'action lécithinasique des toxines correspondantes.

DÉTERMINATION DU TITRE ANTI-LÉCITHINASIQUE DES SÉRUMS ANTI-*perfringens*. — Au cours de tous les essais que nous allons rapporter, nous avons utilisé le même échantillon de sérum humain du groupe A ; nous le devons à l'extrême obligeance de M. Kossovitch.

Pour déterminer le titre anti-lécithinasique des sérums anti-*perfringens*, nous ne pouvions envisager de prendre comme dose d'épreuve de toxine un poids de toxine représentant 2 doses mortelles comme l'ont fait certains auteurs, car il existe dans nos toxines des quantités importantes et variables d'antigène léthal  $\eta$  à côté de l'antigène léthal  $\alpha$  présumé seul responsable de l'action sur le sérum humain.

Nous pouvions prendre comme dose d'épreuve de toxine le poids de toxine D. L. qui produit une opalescence visible dans un sérum humain donné ou un multiple de ce poids et rechercher le volume de sérum anti-*perfringens* qui empêche la dose de toxine employée de rendre le sérum humain opalescent. Nous pouvions encore utiliser comme dose d'épreuve de toxine un multiple de la dose nécrasante D. N. Des titrages préliminaires effectués dans ces voies différentes, avec 11 toxines *perfringens*, ne nous ont pas toujours donné satisfaction. Nous avons alors pris comme dose d'épreuve de toxine le poids de toxine dont l'action opacifiante sur le sérum humain est en partie supprimée par  $1/20^{\circ}$  d'unité anti- $\alpha$  du sérum étalon international  $PE_{20}$  provenant de Copen-



hague ; nous avons désigné cette dose d'épreuve par Lé/20. Nous l'avons utilisée pour évaluer le titre anti-lécithinasique de différents sérums anti-*perfringens* dont nous avons déjà déterminé les titres anti- $\alpha$  et anti- $\beta$ . Nous notons dans le tableau V les titres anti- $\alpha$  de 3 de ces sérums (135, 415 et 589 dosés avec les toxines ES<sub>3</sub>, EP<sub>5</sub>, ES<sub>5</sub>, ES<sub>6</sub>, ES<sub>10</sub>). Le titre anti- $\alpha$  des sérums 135 et 415, par exemple, est respectivement de 20 et 1.200 unités internationales.

TABLEAU V. — Titres anti-lécithinasiques *in vitro* et antitoxiques *in vivo* de 3 sérums anti-*perfringens*. Titrages *in vitro* avec la dose-test Lé/20 et *in vivo* avec la dose-test L + de différents échantillons de toxine *perfringens* plus ou moins complexes.

ÉCHANTILLON de toxine <i>perfringens</i>			TITRES de 3 sérums anti- <i>perfringens</i>					
N°	Elaboré par la souche	Valeur de la dose Lé/20 (en mg.)	Sérum 135		Sérum 415		Sérum 589	
			Titrage <i>in vitro</i> (unités)	Titrage <i>in vivo</i> (unités)	Titrage <i>in vitro</i> (unités)	Titrage <i>in vivo</i> (unités)	Titrage <i>in vitro</i> (unités)	Titrage <i>in vivo</i> (unités)
E <sub>40</sub>	Lechien	0,60	55	100-125	40	450-500	260	
E <sub>31</sub>	Lechien	0,51	50		35	350-400		
EP <sub>6</sub>	A <sub>100</sub> P	0,70	72		38	150	290	
ES <sub>7</sub>	SS	0,38	58	100-110	45	140-150	280	
ES <sub>3</sub>	SS	0,20	50	65-70	30	35	180	200
EP <sub>5</sub>	A <sub>100</sub> P	0,22	75 à 80	65-70	43	35-38	280	260 à 280
ES <sub>5</sub>	SS	0,33		63-65		40-45	220	260
ES <sub>6</sub>	SS	0,16	75	60-63	42	40-45	240	240
ES <sub>10</sub>	SS	0,14	55	65	42	38-40	200	300

Dans le tableau V nous indiquons la valeur Lé/20 des diverses toxines *perfringens* que nous avons titrées. Exemple : la dose-test Lé/20 de la toxine E<sub>40</sub> est de 0,60 mg. ; ce poids de toxine représente 12 doses nécosantes et 10 doses D. L. La dose-test lécithinasique Lé/20 de la toxine ES<sub>7</sub> est de 0,38 mg., elle correspond à 19 doses nécosantes et à 6,9 doses D. L.

D'après nos titrages, le titre anti-lécithinasique du sérum 135 est de 55 unités lorsque le dosage est fait avec la dose-test lécithinasique Lé/20 de la toxine E<sub>40</sub> et de 58 unités lorsque celui-ci est réalisé avec une dose-test Lé/20 de la toxine ES<sub>7</sub>. Il est de 50 unités ou de 72 unités suivant qu'il est effectué avec les toxines E<sub>31</sub> et EP<sub>6</sub>. Ces 4 toxines diffèrent nettement par leur teneur en antigène  $\eta$ . En effectuant le titrage du sérum 135 suivant le même principe que précédemment mais avec 4 toxines sans quantité notable d'antigène  $\eta$ , avec les toxines ES<sub>3</sub>, EP<sub>5</sub>, ES<sub>6</sub> et ES<sub>10</sub>, dont le rapport des doses LN et L+ est égal à 1,1-1,2 ou 1,3, nous

avons constaté que les titres anti-lécithinasiqes du sérum 135 variaient entre 50 et 80 unités (tableau V). Donc, que les déterminations de l'activité anti-lécithinasique des sérums anti-*perfringens* soient réalisées avec des toxines riches en antigène  $\eta$  ou avec des toxines à antigène  $\alpha$  dominant, les résultats varient sensiblement entre les mêmes limites. De ce fait on peut déduire que l'antigène  $\eta$  n'influence pas l'évaluation de l'action anti-lécithinasique des sérums.

D'après les titrages *in vivo* (souris) faits en présence d'une dose-test L+ des toxines ES<sub>3</sub>, EP<sub>5</sub>, ES<sub>6</sub> ou ES<sub>10</sub>, les titres antitoxiques du sérum 135 varient seulement entre 60 et 70 unités anti- $\alpha$  (écart maximum entre les résultats : 14 p. 100 ; voir tableau V). Il existe donc des discordances entre les résultats des titrages *in vitro* précédents et ceux des titrages *in vivo*. Ainsi, d'après les titrages *in vivo*, le sérum 135 contient entre 65 et 70 unités anti- $\alpha$ , que le dosage soit fait avec la toxine EP<sub>5</sub> ou avec la toxine ES<sub>3</sub> ; ce sérum titre 75 à 80 unités anti-lécithinasiqes d'après le titrage avec la toxine EP<sub>5</sub> et 50 unités seulement d'après le titrage avec la toxine ES<sub>3</sub>.

En titrant 2 autres sérums anti-*perfringens* suivant le principe appliqué ci-dessus, nous avons obtenu des résultats qui permettent de formuler les conclusions suivantes : 1° l'antigène  $\eta$  n'influence par les résultats des titrages *in vitro* ; 2° les résultats des titrages *in vitro* correspondent souvent à ceux des titrages effectués *in vivo* avec des toxines à antigène  $\alpha$  dominant ; quelques discordances sont notées ; exemple : le sérum 415, titré avec les toxines EP<sub>5</sub> et ES<sub>10</sub>, est plus anti-lécithinasique *in vitro* qu'antitoxique *in vivo*.

En présence de ces derniers faits, nous nous sommes demandé si l'action lécithinasique de nos toxines ne serait pas intensifiée par le calcium et si la détermination de l'activité anti-lécithinasique des sérums anti-*perfringens* ne serait pas influencée par l'addition de Ca aux toxines.

Nous avons déterminé, en présence de Cl<sub>2</sub>Ca et au moyen du sérum étalon anti-*perfringens* précédent, la dose-test lécithinasique Lé/20 (Ca) de 8 toxines, puis, vis-à-vis de cette dose, le titre anti-lécithinasique des sérums anti-*perfringens* 135, 415 et 589.

Nous indiquons dans le tableau VI la série de mélanges que nous avons préparés pour rechercher en présence de Ca la dose-test Lé/20 (Ca) de la toxine ES<sub>7</sub>. Les mélanges de toxine, de Ca, d'eau physiologique et de sérum étalon sont laissés pendant quarante-cinq minutes à 37°, puis additionnés de sérum humain. Tous les tubes sont portés pendant seize heures à 37°, puis examinés le lendemain pour noter le degré d'opalescence des mélanges. Le tube dans lequel l'opalescence est légère indique la dose Lé/20 (Ca). Ainsi qu'on le voit dans le tableau VI, nous avons utilisé au cours du dosage une solution de toxine ES<sub>7</sub> à 4 mg.

par centimètre cube ; un titrage préliminaire nous avait montré qu'une telle concentration était convenable. Mais pour titrer des toxines plus actives, nous avons préparé des solutions plus diluées : ainsi pour déterminer la dose-test Lé/20 (Ca) de la toxine ES<sub>8</sub>, nous avons fait une solution à 1 mg. par centimètre cube.

En recherchant, en présence de doses variables de Ca, la dose-test de la toxine ES<sub>7</sub>, nous avons constaté que l'on obtenait sensiblement les mêmes résultats que la toxine soit additionnée, dans chaque tube, de 0,05 ou de 0,03 c. c. de Cl<sub>2</sub>Ca à 5 p. 100 ; par contre, l'activation s'est révélée légèrement incomplète en présence de 0,01 c. c. de Cl<sub>2</sub>Ca à 5 p. 100.

TABLEAU VI. — Détermination, en présence de Ca, de la dose-test lécithinasique Lé/20 (Ca) d'une toxine *perfringens*.

Toxine ES <sub>7</sub> (solution à 4 mg. par c. c.) . . . . .	0,09 c. c.	0,08 c. c.	0,07 c. c.	0,06 c. c.	0,05 c. c.
Cl <sub>2</sub> Ca à 5% . . . . .	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.
Eau physiologique . . . . .	0,01 c. c.	0,02 c. c.	0,03 c. c.	0,04 c. c.	0,05 c. c.
Sérum étalon à 1 unité anti-toxique par c. c. . . . .	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.
Sérum humain (chauffé pendant 1 heure à 56°) . . . . .	0,1 c. c.	0,1 c. c.	0,1 c. c.	0,1 c. c.	0,1 c. c.
Opalescence après 16 heures à 37° . . . . .	+++	++	±	—	—

Pour déterminer le titre anti-lécithinasique d'un sérum vis-à-vis d'une toxine donnée, nous préparons avec cette toxine une solution contenant, par centimètre cube, 10 doses Lé/20 (Ca). Dans une série de tubes, nous mettons 0,1 c. c. de cette solution — c'est-à-dire 1 dose Lé/20 (Ca) — puis nous ajoutons le Cl<sub>2</sub>Ca et des doses variables du sérum à titrer (vol. tot. des mélanges : 0,2 c. c.). Les mélanges sont portés pendant quarante-cinq minutes à 37° et après les avoir additionnés de 0,1 c. c. de sérum humain, ils sont remis à l'étuve ; seize heures plus tard nous notons les résultats. Le titre du sérum est indiqué par le tube dans lequel l'opalescence est légère.

RÉSULTATS. — 1° Le calcium augmente à des degrés divers l'action lécithinasique des toxines examinées (comparer les tableaux V et VIII).

2° Les déterminations du titre anti-lécithinasique d'un sérum dosé en présence de Ca concordent souvent avec celles qui sont faites en l'absence de Ca, quelquefois elles en diffèrent de 11 à



17 p. 100. Exemple : a) En présence de la dose-test  $Lé/20$  (Ca) de la toxine  $ES_3$  additionnée de  $Cl_2Ca$ , c'est-à-dire en présence de 0,095 mg. de toxine, le sérum 135 titre 50 unités ; en présence de la dose  $Lé/20$  de la même toxine non additionnée de Ca, c'est-à-dire en présence de 0,20 mg. de toxine, il titre aussi 50 unités.

TABLEAU VII. — Détermination du titre anti-lécithinasique d'un sérum anti-*perfringens*. Titrage en présence de Ca et d'une dose-test  $Lé/20$  (Ca) de la toxine *perfringens*  $E_{40}$ .

Toxine $E_{40}$ (en c. c.). (Solution à 5,2 mg. par c. c.) . . . . .	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$Cl_2Ca$ à 5% (en c. c.). Sérum anti- <i>perfrin-</i> <i>gens</i> 135 (en c. c.). .	0,05 0,05 à 1/50	0,05 0,05 à 1/55	0,05 0,05 à 1/58	0,05 0,05 à 1/60	0,05 0,05 à 1/65	0,05 0,05 à 1/70
Sérum humain (en c. c.), chauffé pen- dant 1 heure à 56°.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Opalescence après 16 heures à 37° . .	—	trace	±	+	++	+++

TABLEAU VIII. — Activité anti-lécithinasique de 3 sérums anti-*perfringens*. Titrage en présence de Ca et d'une dose-test  $Lé/20$  (Ca) de différents échantillons de toxine *perfringens* plus ou moins complexes.

ÉCHANTILLON DE TOXINE		TITRE ANTI-LÉCITHINASIQUE DE 3 SÉRUMS		
N°	Valeur de la dose $Lé/20$ (Ca)	Sérum 135 (unités)	Sérum 415 (unités)	Sérum 589 (unités)
$E_{40}$	0,52	58	32	230
$ES_7$	0,28	58	40	280
$EC_1$	0,35	60	40	
$ES_3$	0,095	50	32	
$EP_5$	0,15	75-80	45-50	
$ES_5$	0,21	62	40	
$ES_3$	0,105	62	36	
$ES_{10}$	0,105	60	42	

b) Ce même sérum titre 75 ou 62 unités vis-à-vis de la toxine  $ES_6$  suivant que le titrage est fait en l'absence ou en présence de Ca.

3° L'écart maximum entre les titres anti-lécithinasiques attribués

à un même sérum au cours des titrages que nous avons effectués *in vitro*, comparativement, avec différentes toxines additionnées de Ca. est de 36 p. 100. Nous avons signalé antérieurement que nous avons observé quelquefois des écarts de 25 à 33 p. 100 entre les résultats obtenus en déterminant *in vivo* le titre d'un même sérum avec une dose-test L+ de différentes toxines à facteur  $\alpha$  prédominant [27].

4° L'analogie est certaine entre les résultats de nombreux titrages réalisés *in vitro* et *in vivo* avec la même toxine à facteur  $\alpha$  prédominant ; le parallélisme fait défaut dans quelques cas.

DISCUSSION. — La concordance fréquente entre les résultats des titrages *in vitro* et *in vivo* peut signifier, ou bien, que le sérum examiné contient autant d'anti-lécithinase que d'antitoxine  $\alpha$ , ou bien, que les 2 activités considérées appartiennent à un seul anticorps ; cette dernière interprétation conduit à penser que la lécithinase et le facteur  $\alpha$  ne constituent qu'un seul et même antigène de la toxine *perfringens* ainsi que tendent à l'admettre Mc Farlane et Knight. Par contre, les divergences notées entre les résultats des 2 méthodes de titrage incitent à supposer que la lécithinase et l'antigène  $\alpha$  sont deux constituants différents de la toxine *perfringens*. Toutefois, cette hypothèse est discutable. Les résultats discordants que nous avons observés ne sont peut-être qu'imputables à la méthode de titrage *in vitro* que nous avons appliquée, aussi, pour vérifier cette éventualité, nous nous proposons de répéter nos dosages avec un test plus sensible que le sérum humain ; ils dépendent peut-être en outre des proportions dans la toxine de différents constituants, tels que le facteur de diffusion, les protéinases. Aussi convient-il de poursuivre les essais avec des toxines de composition connue à divers points de vue avant de tirer une conclusion définitive des résultats discordants observés au cours des titrages *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons signalé précédemment que de nombreuses toxines *perfringens* fraîchement préparées ne sont pas léthales après cinq minutes à 70° et qu'elles le sont après chauffage à 100°. Nous avons fait agir comparativement sur du sérum humain 7 toxines chauffées soit pendant cinq minutes dans un bain-marie à 70°, soit pendant cinq minutes dans un bain-marie à 100°. Nos expériences ont été effectuées avec un sérum du groupe A employé à la dose de 0,2 c. c.

Après chauffage à 70°, une toxine seulement, sur 7, détermine un trouble dans le sérum humain. L'étude plus complète de cette toxine chauffée montre qu'elle est dermonécrosante et très légèrement hémolytique. Les 6 autres toxines sont sans action sur le sérum humain, sur la gélatine et sur les hématies de mouton :

d'après les observations *in vivo*, elles ne sont ni léthales, ni dermonécrosantes. Le chauffage à 70° a donc fait disparaître leurs propriétés lécithinasique, gélatinolytique, hémolytique, léthale et dermonécrosante.

Après chauffage à 100°, les 7 toxines sont dermonécrosantes, léthales et plus ou moins hémolytiques; 6 opacifient le sérum humain : elles déterminent un trouble net aux doses de 0,03 et 0,04 c. c. La septième toxine ne produit aucun trouble dans le sérum, bien qu'elle soit employée aux doses de 0,01, 0,06, 0,08, 0,1 et même 0,15 c. c. Ce fait révèle que le chauffage à 100° nous a permis d'obtenir une toxine dermonécrosante qui est dépourvue d'action lécithinasique en l'absence de calcium; cette observation parle en faveur de l'hypothèse déjà envisagée, à savoir : l'antigène dermonécrosant  $\alpha$  serait distinct de la lécithinase *perfringens*.

Pour essayer encore de dissocier les propriétés dermonécrosantes et lécithinasiques de la toxine *perfringens* A nous avons repris l'étude des toxines précédentes; nous en avons soumis 5 à 2 chauffages successifs, l'un de cinq minutes dans un bain-marie à 70° et l'autre de cinq minutes dans un bain-marie à 100°. Nous les avons éprouvées au point de vue hémolytique, lécithinasique et dermonécrosant après le chauffage à 70° et après le chauffage supplémentaire à 100°. Nous avons antérieurement signalé que les toxines non hémolytiques et non nécrosantes après le chauffage à 70° deviennent hémolytiques et nécrosantes lorsqu'on les porte à 100°. Il était intéressant de rechercher si le chauffage à 100° consécutif au chauffage à 70° rétablirait aussi l'action lécithinasique des toxines. Nos essais ont donné les résultats suivants : après chauffage à 70° et 100°, 2 toxines présentent une forte action nécrosante et une légère action lécithinasique (elles troublent le sérum humain à la dose de 0,1 c. c.); 3 toxines produisent une forte nécrose et ne possèdent pas d'action lécithinasique; parmi ces 3 toxines figure celle qui précédemment n'avait manifesté aucune action lécithinasique après cinq minutes de chauffage à 100°. Donc, dans 2 cas, un chauffage de cinq minutes à 100° consécutif à un chauffage à 70° ne rétablit pas l'action lécithinasique de 2 toxines alors qu'il rétablit leur action nécrosante. Nous nous proposons de poursuivre ces expériences, mais en utilisant, pour l'épreuve enzymatique, différents tests additionnés de calcium.

#### ESSAIS DE SÉPARATION DES ANTIGÈNES DE LA TOXINE *perfringens* A.

Différents auteurs ont essayé de séparer les constituants de la toxine A par des précipitations fractionnées avec le sulfate d'ammonium et le sulfate de soude. Prigge a isolé une fraction peu hémolytique *in vitro* et très nocive *in vivo* d'une fraction très hémolytique.



lytique *in vitro* et peu nocive *in vivo* [58]. L'activité de la première fraction n'a pas été déterminée en présence de réducteurs. Bengston [5] a signalé que l'ultrafiltration de la toxine A avait permis à Stewart et Clampit d'obtenir une fraction toxique pour la souris et sans effet hémolytique sur les hématies de mouton ; toutefois Schneierson et Grabar [61], en appliquant le même procédé, n'ont point abouti à un tel résultat ; ajoutons que Stewart et Clampit n'ont pas recherché si la fraction qu'elles avaient obtenue restait dépourvue d'action hémolytique après addition de cystéine ou de calcium. Par une tout autre technique, Heynigen [35] a réussi récemment à séparer l'hémolysine  $\theta$  de l'antigène  $\alpha$  ; cet auteur, modifiant le procédé utilisé par Weinberg et Nasta [80], a traité rapidement par les hématies de mouton la toxine *perfringens* maintenue à la température de 0°.

Nous avons soumis à ce traitement 10 toxines *perfringens* préparées en bouillon Vf : 3 toxines centrifugées et 7 toxines filtrées, conservées à 2° depuis un ou deux jours. Les globules de mouton, en 5 minutes à 0°, ont diminué de 64 à 95 p. 100 l'effet hémolytique des toxines (titrage en présence d'eau physiologique et de Ca) ; ils n'ont généralement pas amoindri l'activité lécithinasique. Mais toutes nos toxines traitées ont eu un effet hémolytique en présence de tampon phosphaté, ce qui incite à penser qu'elles contenaient encore de l'hémolysine  $\theta$ . En portant à quinze minutes, à trente et même à soixante minutes, la durée de contact des toxines avec les hématies à 0°, nous n'avons pas intensifié l'absorption de l'hémolysine  $\theta$ . Dans toutes les expériences, nous avons employé les hématies lavées et les toxines dans les proportions suivantes : 2 c. c. de globules rouges non dilués et 8 c. c. de toxine. Les toxines traitées par les érythrocytes et séparées de ceux-ci par centrifugation ont été conservées à 2°. L'activité lécithinasique de 4 d'entre elles a peu varié en cinq jours alors que leur activité hémolytique a beaucoup diminué : la cystéine n'a pas rétabli leur titre hémotoxique.

En 1936, Mc Clean [47] a séparé le facteur de diffusion de la toxine *perfringens* A des antigènes léthaux.

### Résumé et Conclusions.

1° Différentes souches de *Welchia perfringens* élaborent dans du bouillon Vf et dans des digestions chlorhydropeptiques de foie ou de placenta une toxine contenant en quantité importante l'antigène nécosant  $\alpha$ , l'hémolysine  $\theta$  et l'antigène non nécosant  $\gamma$ . Les antigènes  $\theta$  et  $\gamma$  font défaut dans les toxines *perfringens* A préparées dans certaines conditions.

2° La toxine *perfringens* complexe (pH 6.8-7.1), fraîchement préparée dans du bouillon Vf, perd généralement, en cinq minutes

dans un bain-marie à la température de 70°, son action létale, son pouvoir hémolytique, nécrosant et gélatinolytique, ainsi que sa propriété de rendre le sérum humain opalescent.

Par contre, après cinq minutes de séjour dans un bain-marie à 100°, la toxine *perfringens* contient fréquemment, par centimètre cube, 2 à 35 D. M. (souris) et 3 à 30 D. H. ; elle est dermonécrosante ; de faibles doses de sérum anti-*perfringens* neutralisent sa nocivité : ces faits indiquent qu'elle contient l'antigène nécrosant  $\alpha$  ; de plus, elle détermine généralement un trouble dans le sérum humain et provoque souvent la liquéfaction de la gélatine. La nocivité *in vivo* de la toxine *perfringens* liquide disparaît en quinze à soixante minutes à la température de 100°.

Quelques toxines chauffées pendant cinq minutes à 100° sont très dermonécrosantes et à peine hémolytiques ; cette observation incite à penser que l'antigène nécrosant  $\alpha$  des toxines chauffées à 100° n'est pas hémolytique ou l'est très peu et que les toxines très hémolytiques après chauffage à 100° contiennent de l'hémolysine  $\theta$ .

Lorsqu'on porte pendant cinq minutes dans un bain-marie à la température de 100° des toxines ayant perdu au cours d'un chauffage préalable de cinq minutes à 70° les diverses activités que nous avons énumérées ci-dessus, on constate qu'après le chauffage à 100° les toxines sont nocives *in vivo*, hémotoxiques et nécrosantes ; bien qu'elles soient dermonécrosantes après ce deuxième chauffage, quelques-unes de ces toxines ne manifestent pas d'activité lécithinasique en l'absence de calcium.

Le mécanisme de la thermorégénération des antigènes de la toxine *perfringens* est complexe.

3° La toxine *perfringens* préparée depuis plusieurs mois (pH 7,2-7,6) est moins thermolabile que la toxine fraîchement préparée ; l'alcalinisation spontanée qui se produit pendant la conservation n'est pas entièrement responsable de ce phénomène.

4° Les antigènes  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\eta$  de la toxine *perfringens* précipitée par le sulfate d'ammonium sont détruits, en solution dans l'eau physiologique alcalinisée à pH 7,6, en trente à soixante minutes à la température de 100°.

5° Le calcium rétablit au taux initial l'activité hémolytique de nombreuses toxines dont le pouvoir lytique a baissé spontanément au cours de la conservation ; de ce fait nous concluons qu'en présence de Ca l'antigène  $\theta$  inactif de certaines toxines atténuées récupère son action hémotoxique.

6° La neutralisation de la diastase gélatinolytique de *W. perfringens* par les sérums anti-*perfringens* n'obéit pas à la loi des proportions multiples.

7° L'antigène  $\eta$  n'influence pas la détermination du titre anti-lécithinasique des sérums anti-*perfringens* dosés en présence de sérum humain et de toxines *perfringens* plus ou moins complexes.

8° Le titre anti-lécithinasique d'un sérum varie dans certains cas avec l'échantillon de toxine employé pour faire la détermination.

9° Les valeurs anti-lécithinasiques attribuées à un même sérum anti-*perfringens*, au cours des titrages réalisés comparativement avec une dose d'épreuve convenable de différentes toxines *perfringens* additionnées de calcium, correspondent souvent aux titres anti- $\alpha$  de ce sérum déterminés avec les mêmes toxines ; cependant il existe quelques discordances : vis-à-vis de certaines toxines à antigène  $\alpha$  prédominant, le même sérum est plus anti-lécithinasique *in vitro* qu'antitoxique *in vivo* et réciproquement.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADEY (C. W.). *Brit. Med. Journ.*, 1935, 2, 748.
- [2] BEHRING (Otto). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1941, 100, 1-18.
- [3] BEHRING (Otto). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1941, 100, 241-256.
- [4] BENZONI (G.). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1938, n° 11.
- [5] BENGSTON (Ida). *Bull. Organ. Hyg. S.D.N.*, 1938, 7, 867-871.
- [6] BERTRAND (Gabriel) et ROSENBLATT (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1914, 158, 1455 et 1823.
- [7] BERTRAND (Gabriel) et ROSENBLATT (M.). *Bull. Soc. Chim.*, 1914, 15, 762.
- [8] BULL (C. G.) et PRITCHETT (I. W.). *J. expe. Med.*, 1917, 26, 119-138 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1917, 80, 957.
- [9] CAMPBELL (E. F.). *J. infect. Diseases*, 1909, 6, 537-563.
- [10] CROOK. Cité par Heyningen (W. E.).
- [11] DALLING (T.), GLENNY (A. T.), MASON (J. H.) et O'BRIEN (R. A.). *British J. ex. Path.*, 1928, 9, 43-48.
- [12] DAVOLI (R.) et FURBETTA (F.). *Boll. Ist. Sieroter. Milan*, 1940, 19, 592-599.
- [13] DERNBY (K. G.) et BLANC (J.). *J. Bact.*, 1921, 6, 419.
- [14] DURAN-REYNALS (F.). *J. exp. Med.*, 1932, 55, 703; 1933, 58, 161.
- [15] DURIEUX (O.). *Bull. Soc. Chim. Biol. de Belgique*, 1914, 28, 99-101.
- [16] GLENNY (A. T.) et ALLEN (K.). *J. Path. a. Bact.*, 1921, 24, 61-63.
- [17] GLENNY (A. T.), BARR (M.), LLEWELLYN-JONES (M.), DALLING (T.) et ROSS (H.). *J. Path. a. Bact.*, 1933, 37, 53-74.
- [18] GÖRTZEN (J.). *Zentralbl. f. Bakt.*, I orig. Bd, 1937, 138, 366.
- [19] GRASSMANN (W.). *Biochem. Zeitschr.*, 1938, 295, 351-368.
- [20] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1941, 66, 204-247.
- [21] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1941, 66, 329-378.
- [22] GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, 136, 403.
- [23] GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, 136, 452.
- [24] GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, 136, 783.
- [25] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1943, 69, 146-157.
- [26] GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 1944, 70, 148-154.
- [27] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *Ces Annales*, 1942, 68, 513-517.
- [28] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1943, 137, 757.



- [29] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 207-223.
- [30] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 206.
- [31] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 273 et 302.
- [32] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 794.
- [33] GUILLAUMIE (Maylis), KREGUER (A.) et FABRE (M.). *Ces Annales*, 1946, **72**, 12 à 37.
- [33 a] HARTLEY (P.). Société des Nations. Rapport de l'Organisation d'Hygiène. Rapport de la Commission permanente de Standardisation biologique. N° officiel : C. H. 1056 (1). Londres, 23 juin 1931, p. 13 à 28.
- [34] HEYNINGEN (W. E.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1246-1256.
- [35] HEYNINGEN (W. E.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1257-1269.
- [36] HENRY (H.). *J. Path. a. Bact.*, 1922, **25**, 1-18 ; 1923, **26**, 495-506.
- [37] HIRAYAMA (F.). *J. oriental Medic.*, 1924, **2**, 105.
- [38] IPSEN (Johs) et DAVOLI (R.). *Bull. Org. Hyg. S.D.N.*, 1939, **8**, 899-916.
- [39] IPSEN (Johs), LLEWELLYN-SMITH (M.) et SORDELLI (A.). *Bull. Org. Hyg. S.D.N.*, 1939, **8**, 859-889.
- [40] KENDALL (A.). *J. infect. Dis.*, 1927, **40**, 689-697.
- [41] KENDALL (A. I.) et SCHMITT (F. O.). *J. infect. Dis.*, 1926, **39**.
- [42] KENDALL (A. I.) et GEBAUER (E.). *J. infect. Dis.*, 1930, **47**, 261-266.
- [43] KLOSE (F.). *Zeitschr. f. Hygiene*, 1916, **82**, 197-234 ; *Munch. Med. Woch.*, 1916, **63**, 723-726.
- [44] KOJIMA (K.). *Bioch. Zeitschr.*, 1922, **128**, 519-533.
- [45] KOOPMANSCH (W.). *Acta biol. Belgica*, 1942, **4**, 123-125.
- [46] KOSTUCH (Z.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 352-354 ; *Schweiz. Zeitsch. f. allgem. Path. u. Bakt.*, 1938, **4**, 227-239.
- [47] MC CLEAN (Douglas). *J. Path. a. Bact.*, 1936, **42**, 477-512.
- [48] MC COY (E.) et MC CLUNG (L. S.). *Bact. Reviews*, 1938, **2**, 47-97.
- [49] MC FARLANE (M. G.) et KNIHGT (B. C.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 884-902.
- [50] MC GAUGHEY (C. A.). *J. Path. a. Bact.*, 1933, **36**, 263-272.
- [51] MASCHMANN (E.). *Biochem. Zeitschr.*, 1937, **295**, 1-10 ; 1938, **295**, 351-368.
- [51] MASCHMANN (E.). *Biochem. Zeitschr.*, 1937, **295**, 1-10 ; 1938, **295**.
- [53] MEISEL (H.). *Zeitsch. f. Immunitätsf.*, 1938, **92**, 79-86.
- [54] NAGLER (F. P. O.). *Brit. J. exp. Path.*, 1939, **20**, 473-485.
- [55] PASSINI (F.). *Wien. Klin. Woch.*, 1905, **18**, 921-925.
- [56] POZERSKI (E.) et GUELIN (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 514 et 609.
- [57] PRIGGE (R.). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1936, **89**, 477-483.
- [58] PRIGGE (R.). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1937 **91**, 457-463.
- [59] RAMON (Gaston). *C. R. Acad. Sci.*, 27 mars 1944, **218**, 535-538.
- [60] SCHIFF (Fritz). *J. infect. Dis.*, 1939, **65**, 127-134.
- [61] SCHNEIERSON (S. Stanley) et GRABAR (Pierre). *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **130**, 1451.
- [62] SEIFFERT (G.). *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1939, **96**, 515-520.
- [63] SHIRAIISHI (S.). *Japan J. exp. Med.*, 1931, **9**, 613-618.
- [64] SMITH (L.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 755.

- [65] SMITH (L.) et LINDSLEY (C. H.). *J. Bact.*, 1939, **38**, 221-229.
- [66] SÖRENSEN (S. P. L.). *Ergeb. d. Physiol.*, 1912, **12**, 393-532.
- [67] STAHLY (G. L.) et WERKMAN (C. H.). *J. Bact.*, 1933, **25**, 37-38.
- [68] STEWART (Sarah, E.). *Public Health Reports.*, 1940, **55**, 753-773.
- [69] STEWART (S. E.) et CLAMPIT (J. M.). Voir BENGSTON (I.).
- [70] TISSIER (H.) et MARTELLY. *Ces Annales*, 1902, **16**, 865-903.
- [71] TZEKHOVITZER (M.) et KAROUTH (T.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1094.
- [72] WALBUM (L. E.) et REYMANN (C. G.). *J. Path. a. Bact.*, 1933, **36**, 469-483.
- [73] WALBUM (L. E.) et REYMANN (C. G.). *J. Path. a. Bact.*, 1934, **39**, 669-679.
- [74] WASSERMANN. *Veröffentlich. a. d. Geb. d. Militärsanitätswesens*, 1918, H. **68**.
- [75] WEIL (L.), KOCHOLATY (W.) et SMITH (L.). *Biochem. Journ.*, 1939, **33**, 893-897.
- [76] WEINBERG (M.) et COMBIESCO (N.). *Ces Annales*, 1930, **45**, 547-580.
- [77] WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1275 ; *Rev. d'Immunol.*, 1936, **2**, 513-540.
- [78] WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 667 ; *ibid.*, 1937, **126**, 656 ; *ibid.*, 1938, **127**, 1084 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1937, **204**, 1012.
- [79] WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *Bull. Org. Hyg. S. D. N.*, 1938, **8**, 883-892 ; *Rev. Immunol.*, 1939, **5**, 5-33 ; *Bull. Acad. Méd.*, 1939, **121**, 20-27.
- [80] WEINBERG (M.) et NASTA (M.). *Ces Annales*, 1920, **34**, 690-700.
- [81] WILSDON (A. J.). *Second report of the Director of the Institute of Animal Path.*, Cambridge, 1931, 53.
- [82] WILSDON (A. J.). *3d report of the Director of the Institute of Animal Path.*, Cambridge, 1931-1933, 46-51.
- [83] ZEISSLER (J.). *Final Report*, London, II<sup>e</sup> Congrès intern. de microb., 1937, 178.

## SUR LA PRÉSENCE GÉNÉRALE DU RUBIDIUM CHEZ LES PLANTES (1)

par MM. GABRIEL BERTRAND et DIDIER BERTRAND.

Peu après la découverte, en 1850, par Bunsen et Kirchhoff, à l'aide du spectroscope, d'un nouveau métal alcalin, le rubidium, dans le monde minéral, Grandeau reconnut, de la même manière, l'existence de cet élément dans le salin de betterave, c'est-à-dire dans le règne végétal. Se servant de chlorure de platine, il réussit à extraire de ce salin, qui n'est autre chose que la partie soluble dans l'eau des cendres de la racine, environ 1,3 g. de chlorure de rubidium par kilogramme, quantité correspondant à 0.004 g. du nouveau métal par kilogramme de racine fraîche. Grandeau étendit sa recherche, mais seulement au point de vue qualificatif, à neuf espèces végétales : il en trouva des quantités plus ou moins perceptibles au spectroscope dans cinq et pas trace dans les autres (2).

A la suite de ces résultats, la présence du rubidium dans le règne végétal a été considérée longtemps comme un fait plutôt exceptionnel et l'on ne retenait guère à son sujet que le cas de la betterave, à cause de l'importance agricole et industrielle de cette plante. Mais, depuis lors, les idées ayant changé touchant la composition élémentaire de la matière vivante, on s'est intéressé à nouveau à la question.

En 1917, W. O. Robinson, Steinkönig et Miller ont examiné 25 végétaux : dans 3 d'entre eux ils n'ont rencontré que des traces de rubidium et dans 5 autres pas du tout (3). En 1926, Freundler a signalé ce métal dans une Laminaire (4). Puis, en 1929, et en 1936, Ramage a reconnu sa présence, à l'aide du spectroscope, dans un petit nombre d'espèces végétales (5). Plus récemment

(1) Un résumé de ce mémoire a été publié dans les *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **249**, p. 325, et *Erratum, ibid.*, p. 632.

(2) *Ann. Chim. Phys.*, 1862, **67**, 3<sup>e</sup> série, 155. Dans une note des *C. R. Acad. Sci.*, 1862, **55**, 430, LEFEBVRE confirme la découverte de GRANDEAU.

(3) *U. S. Dept. Agr. Bull.*, 1917, n° 600, (d'après BLANCHETIÈRE, dans le *Traité de Physiologie*, de ROGER et BINET, Paris, 1933, **1**, 825).

(4) *C. R. Acad. Sci.*, 1926, **182**, 1158.

(5) *Nature*, 1929, **123**, 601-602, et 1936, **137**, 67.

encore, en 1931-1932, Burkser et ses collaborateurs ont dosé le rubidium, en se servant de chlorure stannique, dans trois plantes et en ont trouvé des traces dans une quatrième (6). Enfin, en 1933, Boyd et De ont signalé sa présence dans quelques espèces par la méthode spectrographique (7).

Ces résultats successifs ont confirmé, dans ce qu'ils avaient d'essentiel, ceux obtenus par Grandeau ; ils ont prouvé, en outre, que la présence du rubidium était plus fréquente dans le règne végétal qu'on le croyait d'abord ; mais ils n'ont pas conduit à supposer, bien au contraire, que l'existence du rubidium pouvait être générale chez les plantes. Dans l'intention d'aborder ce côté de la question avec chance de succès, il était indispensable d'établir une méthode de recherche et de dosage susceptible de déceler et d'évaluer de très petites quantités du métal alcalin, une méthode assez précise, en tout cas, pour savoir avec certitude si les nombreuses absences enregistrées jusqu'alors étaient dues ou non à une insuffisance des moyens utilisés dans les analyses.

#### A. — MÉTHODE D'ANALYSE.

C'est une des raisons pour lesquelles nous avons, en collaboration avec Cl. Courty, étudié et mis au point la méthode de dosage spectrographique du rubidium dans les sels alcalins dont nous avons donné une brève description l'année dernière à l'Académie des Sciences (8).

Cette méthode, de haute sensibilité et précision, permet de déterminer, par exemple, dans 10 mg. d'un mélange de chlorures de potassium et de rubidium, depuis la quantité supérieure de 0,5 mg. de rubidium, jusqu'à la quantité inférieure de 0,0002 mg., l'erreur restant inférieure à 5 p. 100 entre 0,5 mg. et la quantité, encore bien minime, de 1/1.000 seulement de milligramme.

Mais on ne peut obtenir la même sensibilité et la même précision quand le rubidium est engagé dans un mélange de composition aussi complexe et aussi variable que cela se rencontre dans le cas des cendres d'origine biologique. Lorsqu'on veut appliquer cette méthode purement physique avec tous ses avantages à la détermination qualitative et quantitative du rubidium dans les cendres végétales, *il faut faire subir à celle-ci un traitement chimique préalable* : il faut séparer les métaux alcalins de la silice et des autres combinaisons minérales qui les accompagnent et les amener à l'état

(6) *Zeitschr. anal. Chem.*, 1930, **80**, 264-270 ; *Biochem. Z.*, 1931, **233**, 58 ; *Trav. Labor. Biogéochim. de Acad. Sci. de l'U. R. S. S.*, 1932, **2**, 85-90.

(7) *Ind. J. Med. Res.*, 1933, **20**, 789.

(8) *C. R. Acad. Sci.*, 1943, **247**, 520.



de chlorures. Pour cela, la solution chlorhydrique des cendres, dont la silice a été éliminée par évaporation à sec suivant la technique courante, est débarrassée en bloc de l'aluminium, du fer, du manganèse, du calcium et du magnésium par le phosphate d'ammoniac en milieu fortement ammoniacal ; on filtre, on évapore l'ammoniaque du liquide au bain-marie et l'on précipite l'excès d'acide phosphorique, ainsi que l'acide sulfurique, en ajoutant une solution aqueuse de chlorure de plomb ; le plomb en excès est précipité à son tour par l'hydrogène sulfuré ; on évapore la solution à sec, puis on chauffe le résidu au rouge naissant pour chasser les sels ammoniacaux. Il reste un mélange de chlorures alcalins, formé surtout de chlorure de potassium, mais contenant toujours plus ou moins de chlorure de sodium (9). C'est sur 10 mg. de ce mélange, dont on a d'abord déterminé le poids total, que l'on effectue le dosage spectrographique.

Le minimum de la quantité de rubidium dosable par cette méthode étant, comme il a été vérifié par de nombreux dosages sur des mélanges synthétiques, de 0.2/1.000 de milligramme (0.2  $\gamma$ ), il nous a été possible de n'utiliser pour chaque analyse qu'un poids de plante ou d'organe végétal secs atteignant 1 à 2 grammes au plus et d'atteindre cependant une précision de quelques pour cent sur le chiffre de rubidium.

#### B. — ORIGINE ET PRÉPARATION DES PLANTES.

Nous avons opéré sur des Cryptogames et sur des Phanérogames.

CRYPTOGAMES. — Les champignons basidiomycètes (pieds et chapeaux) ont été recueillis dans les environs de Paris avec tous les soins voulus pour éviter leur souillure par de la terre et emportés au laboratoire après avoir été enveloppés séparément dans du papier à filtre.

L'*Aspergillus* a été obtenu par culture sur du milieu de Raulin ordinaire. Le mycélium, noir de conidies au moment de la récolte, a été débarrassé du liquide qui en mouillait la face inférieure par

(9) Gab. BERTRAND et PERIETZEANU, C. R. Acad. Sci., 1927, 184, 645 et Bull. Soc. chim., 1927, 41, 1475. — G. BERTRAND et M. ROSENBLATT, C. R. Acad. Sci., 1928, 186, 200 et 266. Comme le chlorure de Na influence l'intensité des raies du rubidium dans une proportion différente de celle du chlorure de K, le Na a été dosé et l'on a tenu compte du chiffre trouvé pour corriger les lectures du spectrographe, suivant un abaque établi préalablement. La méthode complète sera publiée dans une autre revue.

un lavage rapide avec de l'eau distillée, puis essoré sur du papier à filtre, pesé, séché à l'étuve et pesé de nouveau.

La levure provenait d'un pain de levure pressée, « de boulangerie », de la fabrique Springer ; elle avait été desséchée par évaporation à la glacière et conservée dans cet état jusqu'à la prise d'essai ; on y a déterminé à ce moment l'humidité résiduelle.

Les algues, envoyées obligeamment par le laboratoire de Roscoff, avaient été débarrassées de l'eau de mer qui les imprégnait à leur arrivée par une rapide immersion dans l'eau distillée, suivie d'un essorage comme pour l'*Aspergillus*.

Enfin, la fougère, ou plutôt les frondes de cette plante ont été prélevées, très proprement, en Vendée, à une époque où leur face inférieure étaient couverte de sporanges.

PHANÉROGAMES. — La plupart des plantes phanérogames que nous avons examinées étaient des herbes. Nous les avons alors récoltées, soit après culture dans le jardin de l'Institut Pasteur, soit à l'état sauvage, mais dans les deux cas (sauf indication contraire) au moment de la floraison. D'une manière générale, ces plantes ont été lavées rapidement, débarrassées de terre ou de poussière, puis essorées entre des feuilles de papier à filtre avant d'être divisées et pesées. Les racines sont difficiles à débarrasser complètement des particules de terre, aussi les a-t-on le plus souvent éliminées pour n'examiner que la partie aérienne de la plante. C'est seulement dans quelques cas où le lavage a permis d'avoir des racines propres qu'on a séparé celles-ci pour les analyser à part. Dans quelques cas, nous avons soumis à un examen comparatif des parties plus nombreuses d'une même plante : tige, feuilles, fleurs, etc. Les feuilles du Tabac à fumer, originaires de la Dordogne, étaient de belles feuilles destinées à l'enrobage des cigares ; elles n'avaient encore subi aucun traitement à la Manufacture, d'où le directeur, M. Dubrisay, a bien voulu nous les adresser ; elles ont été simplement nettoyées au pinceau avant l'analyse. Les graines ont toujours été utilisées à l'état mûr, par conséquent relativement sèches.

Des arbres, nous n'avons guère analysé que les feuilles. Celles du Marronnier d'Inde venaient du jardin de l'Institut Pasteur ; par contre, celles du Figuier, du Laurier, du Pin et du Cèdre, ont été tirées d'un parc de la Vendée. Le Soja, le Haricot et les deux Lupins ont été mis obligeamment à notre disposition par M. Demolon, directeur de la Station de Recherches agronomiques de Versailles où nous sommes allés les prélever.

Quant aux plantes et parties de plantes dont le nom est précédé d'une croix (+), nous nous les sommes procurées dans le commerce. Les plantes provenant du jardin de l'Institut Pasteur ont leur nom précédé d'un astérisque (\*).

## C. — RÉSULTATS OBTENUS.

NOM DES PLANTES ou organes végétaux	MATIÈRE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	K en grammes par kilogramme de matière sèche	Na en grammes par kilogramme de matière sèche	RUBIDIUM en milligrammes par kilogramme de matière sèche
<b>Cryptogames.</b>					
CHAMPIGNONS.					
<i>Amanita citrina</i> Schaeffer . . .	3,9	10,5	51,1	0,56	242
<i>Collybia fusipes</i> Bulliard . . .	10,1	6,26	13,2	0,42	2,8
<i>Tricholoma cnista</i> Fries . . .	8,1	8,06	31,8	0,85	354
<i>Russila queletii</i> Fries . . .	11,2	5,8	33,3	1,79	115
<i>Boletus chrysanteron</i> Bulliard .	0,3	8,62	37,5	0,35	7,7
<i>Boletus leucophaeus</i> Pers. . .	9,4	11,14	40,9	1,44	92,6
<i>Aspergillus niger</i> v. Tieghem .	16,5	4,36	14,8	0,23	3,8
+ Levure de boulangerie ( <i>Sacch.</i> <i>cer.</i> ) . . . . .	86,4	5,17	19,9	0,16	24,7
ALGUES.					
<i>Ulva lactuca</i> L. (plante entière).	21,8	32,1	6,1	19,40	13,2
<i>Fucus vesiculosus</i> L. (plante en- tière) . . . . .	93,4	34,0	23,6	50,80	31,2
FOUGÈRES.					
Grande Fougère ( <i>Pter.-aquil.</i> L.).	31,0	7,15	18,9	1,50	17,6
<b>Phanérogames.</b>					
GYMNOSPERMES.					
Cèdre ( <i>Pinus cedrus</i> L.) [aiguil- les] . . . . .	41,4	3,9	7,0	1,10	7,4
Pin (espèce non déterminée) [aiguilles] . . . . .	32,5	2,75	7,3	0,30	6,9
MONOCOTYLÉDONES.					
* Mais ( <i>Zea mays</i> L.) [partie aé- rienne] . . . . .	12,1	9,8	33,6	0,21	15,9
+ Oignon ( <i>Allium cepa</i> L.) [pousses].	13,8	7,1	25,1		34
* Poireau ( <i>Allium porrum</i> L.) [feuilles vertes] . . . . .	12,5	6,5	46,0	2,24	10,4
* Lis blanc ( <i>Lilium cand.</i> L.) [tige].	18,8	1,77	1,7	0,18	19,7
* Lis blanc ( <i>Lilium cand.</i> L.) [feuilles] . . . . .	12,0	6,92	0,8	0,33	2,1
* Lis blanc ( <i>Lilium cand.</i> L.) [pé- rianthe] . . . . .	10,3	6,9	23,5	0,28	28,5
* Lis blanc ( <i>Lilium cand.</i> L.) [an- thères] . . . . .		7,8	30,4	0,37	71,0
* Lis blanc ( <i>Lilium cand.</i> L.) [pollen] . . . . .		3,47	10,5	0,16	6,9
* Lis blanc ( <i>Lilium cand.</i> L.) [ovaire] . . . . .	12,6	7,56	21,6	0,23	27,6
DICOTYLÉDONES.					
Figuier ( <i>Ficus carica</i> L.) [feuilles].	23,5	14,0	16,4	0,56	6,5
* Houblon ( <i>Humul. Lupul.</i> L.) [feuilles] . . . . .	18,4	28,0	14,5	0,70	22,5
* Ricin ( <i>Ricin. commun.</i> L.) [feuilles].	13,5	19,3	36,5	0,24	17,4
Laurier ( <i>Laurus nobil.</i> L.) [feuilles].	48,4	3,7	5,2	1,52	3,5
Sarrasin ( <i>Polyg. fagop.</i> L.) [par- tie aérienne] . . . . .	20,0	9,0	11,9	0,62	66,6

NOM DES PLANTES ou organes végétaux	MATIÈRE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	K en grammes par kilogramme de matière sèche	Na en grammes par kilogramme de matière sèche	RUBIDIUM en milligrammes par kilogramme de matière sèche
+ Oseille ( <i>Rumex acet.</i> L.) [feuilles].	9,6	12,7	39,0	1,97	35
+ Salicorne ( <i>Salic. radic.</i> Sm.) [feuilles].	12,2	48,2	15,0		8,1
Salicorne (autre récolte) [feuilles].	13,9	46,8			33,5
Betterave ( <i>Beta vulg.</i> L.) [racine].	9,9	10,3	63,0	23,00	32,4
Plantain ( <i>Plant. lanc.</i> L.) [par- tie aérienne].	29,5	10,9	11,3	1,60	48,0
Orobanche ( <i>Orob. rapum</i> Th.) [tige, fleur].	8,9	7,0	14,7	0,18	2,1
Tabac ordinaire ( <i>Nicot. tab.</i> L.) [feuille].		0,2	37,1	0,43	49,5
* Tabac des paysans ( <i>Nic. rus- tic.</i> L.) [partie aérienne].	9,2	22,4	48,0	1,05	39,0
* Pomme de terre ( <i>Solan. tub.</i> L.) [partie aérienne].	9,2	14,5	30,8	0,87	30,0
+ Pomme de terre ( <i>Solan. tub.</i> L.) (tubercules).	29,5	3,8	16,2	0,15	20,8
+ Laitue ( <i>Lact. sativ.</i> L.) [feuilles vertes].	6,2	24,8	95,0	5,00	30,7
* Pissenlit ( <i>Tarax. off.</i> Vill.) [feuilles].	13,8	14,9	51,4	0,16	63,5
* Souci ( <i>Calend. arv.</i> L.) [partie aérienne].	15,3	11,6	37,0	2,75	6,2
+ Café du Brésil ( <i>Coff. arab.</i> L.) [graines].	90,5	4,5	142,0	0,19	45,7
+ Persil ( <i>Petros. sat.</i> Hoffm.) [plan- te entière avec racine].	11	9,1	25,6	1,08	8,3
+ Fenouil ( <i>Foen. off.</i> All.) [partie aérienne].	19,3	11,4	24,7	7,86	15,0
Carotte sauvage ( <i>Dauc. carot.</i> L.) [partie aérienne].	23,1	11,0	24,0	2,02	17,1
Carotte sauvage ( <i>Dauc. carot.</i> L.) (racine).	3,7	5,4	41,5	7,40	10,6
* Soja noir de Tokio ( <i>S. hisp.</i> Mönch) [partie aérienne].	18,8	12,5	28,5	0,53	8,1
* Soja noir de Tokio ( <i>S. hisp.</i> Mönch) [racine].	17,4	11,6	16,1	0,38	4,2
Haricot ( <i>Phaseol. vulg.</i> L.) [par- tie aérienne].	18,2	13,5	15,5	0,53	3,3
Haricot ( <i>Phaseol. vulg.</i> L.) [racine].	20,1	9,6	10,5	1,40	7,5
Haricot ( <i>Phaseol. vulg.</i> L.) [graines].	89,5	3,7	14,0	0,09	17,3
* Pois ( <i>Pisum sat.</i> L.) [feuilles].	11,0	13,2	8,3	4,22	8,1
Trèfle ( <i>Trif. prat.</i> L.) [partie aérienne].	23,6	7,07	6,7	0,75	26,0
* Luzerne ( <i>Medic. sat.</i> L.) [feuilles].	22,8	9,7	7,5	1,40	20,6
+ Lupin jaune ( <i>Lup. lute.</i> L.) [graines].	83,5	2,5	10,6	0,60	32,4
Lupin blanc ( <i>Lup. alb.</i> L.) [racine].	30,3	10,7	16,5	1,60	26,7
Lupin blanc ( <i>Lup. alb.</i> L.) [par- tie aérienne].	12,2	7,2	11,2	1,15	20,3
Monotrope ( <i>Monot. hypoph.</i> L.) [tige entière].	16,5	6,0	20,0	0,25	22,0
* Marronnier ( <i>Aesc. hippoc.</i> L.) [feuilles].	24,2	5,9	18,0	0,83	7,4
* Mauve ( <i>Malva rotundif.</i> L.) [partie aérienne].	11,8	20,0	37,4	2,40	16,0
+ Radis ( <i>Raphan. sat.</i> L.) [partie aérienne].	8,6	17,5	47,9	1,60	17,2



NOM DES PLANTES ou organes végétaux	MATIERE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100 de matière sèche	K en grammes par kilogramme de matière sèche	Na en grammes par kilogramme de matière sèche	RUBIDIUM en milligrammes par kilogramme de matière sèche
+ Radis ( <i>Raphan. sat. L.</i> ) [racine].	6,8	12,1	46,3	4,30	31,6
* Moutarde blanche ( <i>Sinap. arv. L.</i> ) [partie aérienne]. . . . .	12,6	18,4	17,2	3,01	35,3
* Colza ( <i>Brassic. nap. ol. D. C.</i> ) [partie aérienne]. . . . .	8,9	22,2	25,5	2,61	81,0
* Chélidoine ( <i>Chelid. maj. L.</i> ) [partie aérienne]. . . . .	17,9	142,0	25,8	0,25	22,0
* Pivoine ( <i>Pæon. off. Retz</i> ) [par- tie aérienne]. . . . .	16,5	12,3	24,5	0,28	9,4

## D. — RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nos recherches ont porté, comme on voit en examinant le tableau ci-dessus, sur plus de 60 plantes ou parties de plantes appartenant à 52 espèces différentes ; ces espèces occupent des échelons très variés de l'échelle botanique et, d'autre part, se développent dans des milieux nutritifs divers : terrestre (le plus grand nombre), marin (algues, soude et salicorne), organique (*Aspergillus*, levure), certaines même (orobanche, monotrope) vivent en parasites sur d'autres espèces.

Dans tous les cas, nous avons rencontré et pu doser le rubidium. Les proportions de ce métal ont été trouvées comprises chez les Phanérogames entre 2,1 mg. pour les feuilles de Lis blanc et 81 mg. pour la portion aérienne du colza et chez les Cryptogames entre 2,8 mg. pour *Collybia fusipes* et 354 mg. pour *Tricholoma cnista*. Il est évident, d'après ces chiffres, que dans les cas où les auteurs précités n'ont pas trouvé de rubidium, c'est parce que la sensibilité des méthodes qu'ils ont utilisées était insuffisante.

Les moyennes générales sont respectivement chez les deux grands groupes de végétaux de 20,3 mg. et 75,5 mg. par kilogramme de matière sèche. Cette différence provient surtout de la richesse relative et vraiment remarquable de quelques champignons basidiomycètes, mais on ne peut encore dire, à cause du petit nombre des espèces étudiées, que ces Cryptogames soient en général plus riches que les autres végétaux. Il y a là une question de biochimie comparée qu'il sera intéressant d'examiner dès que les circonstances le permettront.

On remarquera que, chez les Phanérogames, la racine de la betterave, dont la teneur en rubidium avait d'abord surpris, n'est pas un cas exceptionnel, que bien d'autres espèces comme le sarrazin, le tabac, le pissenlit, le colza sont même encore plus riches.

En résumé, il se dégage des résultats qui viennent d'être exposés : 1° que le rubidium doit être ajouté à la liste des métaux dont la présence est constante dans les espèces végétales ; 2° que les proportions de cet oligoélément qui existent chez les plantes sont relativement élevées puisqu'elles vont de quelques milligrammes à quelques centigrammes par kilogramme de matière sèche et peuvent même atteindre, chez certaines espèces, plusieurs décigrammes.

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (15°.)

Séance du 1<sup>er</sup> février 1945.

Présidence de M. GASTINEL.

## COMMUNICATION (*SUITE ET FIN*)

### **DISSOCIATION D'UNE SOUCHE DE BACILLES TUBERCULEUX VIRULENTS DE TYPE BOVIN « DYSGONIQUE » EN UNE VARIANTE AVIRULENTE ÉGALEMENT « DYSGONIQUE » ET UNE VARIANTE VIRULENTE « EUGONIQUE » APRÈS SÉJOUR PROLONGÉ DANS UN LIQUIDE PLEURAL DE COBAYE**

par F. VAN DEINSE.

Un cobaye fut inoculé, le 1<sup>er</sup> juin 1942, par voie médiastinale, avec 2 mg. d'une culture bovine « Taureau » virulente et « dysgonique » sur milieu de Löwenstein. L'animal succomba dix jours plus tard et à l'autopsie nous trouvâmes, dans la plèvre, 12 c. c. d'un liquide louche et sanguinolent. Nous n'avons pas réussi à déceler des bacilles sur les frottis de ce liquide ; cependant, l'ensemencement sur milieu de Laporte (à l'œuf-sérum), de ce liquide apparemment abacillaire, donna des cultures lisses confluentes.

La moitié du liquide fut récoltée dans 1 c. c. de solution citratée à 5 p. 100, l'autre moitié, gardée telle quelle, se coagula en une demi-heure. Les deux moitiés furent mises à l'étuve à 38°. Le 7 juillet, donc après vingt-six jours de séjour à l'étuve, les frottis, préparés avec une parcelle du coagulum d'une part, et avec 1 goutte du liquide citraté d'autre part, furent encore négatifs. Mais le 16 du même mois, donc au trente-cinquième jour, nous vîmes, sur les deux frottis faits ce jour-là, quelques gros amas, en forme de moustache, de bacilles acido-résistants caractéristiques. Le 27, quarante-sixième jour, nous ne trouvâmes pas seulement d'énormes paquets de bacilles sur les frottis, mais encore put-on voir, à l'œil nu, de petits grains blanchâtres au fond du tube contenant le liquide citraté : c'étaient de véritables

colonies. Le 6 octobre, cent dix-sept jours après leur mise à l'étuve, il y eut toujours, dans les deux échantillons, des quantités formidables de bacilles, mais ceux-ci étaient moins bien colorés qu'avant. Le 23 février 1943, 1 c. c. du liquide citraté, contenant d'innombrables bacilles, fut inoculé à un cobaye, qui mourut tuberculeux quatre mois plus tard. Enfin, le 11 juin 1943, après un séjour d'un an à l'étuve, le coagulum était devenu inutilisable par dessèchement. Dans le liquide citraté, nous trouvâmes de nombreux amas de petits bacilles faiblement colorés et semblant être en état de lyse. Quelques gouttes de ce liquide furent ensemencées sur milieu de Laporte et le reste inoculé à un cobaye. Celui-ci est mort sept mois plus tard d'une tuberculose généralisée à marche chronique et à prépondérance lymphatique : il y eut notamment un énorme paquet de glandes trachéo-bronchiques. L'ensemencement des organes de ce cobaye sur milieu de Löwenstein nous a donné une culture composée de colonies rugueuses, « eugoniques », à virulence normale pour le cobaye, un peu diminuée pour le lapin.

Par contre, les ensemencements sur milieu de Laporte de ce liquide âgé d'un an ont donné naissance à quelques colonies lisses, « dysgoniques », poussant assez péniblement sur milieu de Laporte et dans celui de Besredka, sur lesquels nous les avons réensemencées, et cette culture, que nous avons appelée « Taureau-un-an », s'est montrée dénuée de virulence pour les cobayes et les lapins, auxquels nous l'avons inoculée à la dose de 0,1 à 0,25 mg.

Il se dégage de cette expérience quelques faits qui nous semblent intéressants. D'abord nous constatons cette faculté que possèdent les rares bacilles tuberculeux, se trouvant dans un liquide pleural de cobaye au moment de la mort de l'animal, de se développer abondamment dans ce liquide, sans qu'on ait besoin d'y ajouter aucune substance étrangère, nutritive ou tampon. Il suffit de mettre le liquide à l'étuve tel quel. On sait que E. Buc avait recommandé de « tamponner » les liquides pleuraux, provenant des épanchements séro-fibrineux humains, pour empêcher l'alcalinisation, et qu'il obtenait ainsi des cultures de bacilles tuberculeux dans les liquides en question (1). Nous avons assisté à l'éclosion de cultures abondantes de bacilles tuberculeux dans les liquides de pleurésie expérimentale, dont le pH avait largement dépassé 8. Car l'expérience que nous venons d'exposer n'est pas le seul exemple de culture directe dans le liquide que nous avons relevé parmi nos observations de pleurésie expérimentale chez le cobaye. Les bacilles présents dans le liquide au moment de la mort de l'animal, souvent si peu nombreux qu'on n'arrive pas à les déceler à l'examen microscopique, semblent donc trouver un milieu nutritif qui leur convient dans certains échantillons de ces liquides pleuraux, malgré un pH élevé.

Ensuite nous voudrions attirer l'attention sur les signes de lyse qu'ont présentée les bacilles, développés dans ce liquide, après un long séjour à l'étuve, lyse qu'on peut interpréter comme signe de vieillesse de la culture. Ce n'est pas non plus le seul exemple de lyse bacillaire que nous ayons observé dans un liquide de pleurésie expérimentale.

(1) *Rev. Tub.*, 1924, 520.



Cette lyse a même été, dans une autre expérience, jusqu'à la disparition complète, en deux mois, des éléments acido-résistants, qui, comme dans l'expérience relatée ici, s'étaient d'abord développés très abondamment dans le liquide en question. Lesensemencements de ce liquide, redevenu abacillaire, sont restés stériles, mais les cobayes, inoculés avec ce même liquide après disparition des bacilles par lyse, sont morts tuberculeux. Il restait donc encore des éléments virulents dans ce liquide pleural qui avaient échappé à l'examen microscopique.

Enfin, ce qui retient surtout notre attention, dans l'expérience formant le sujet de cette note, c'est la dissociation qui s'est opérée dans la culture de bacilles tuberculeux employée, en deux variantes, l'une virulente, l'autre avirulente. Par l'inoculation au cobaye de ce qui restait du liquide après un an, les quelques éléments virulents que contenait encore la culture, développée dans le liquide, ont pu être sauvés : ils ont pu être isolés des organes du cobaye inoculé et mort tuberculeux, sous forme de colonies rugueuses, « eugoniques », alors que la souche bovine originelle virulente était du type lisse « dysgonique ». Par contre, à l'ensemencement de ce même liquide pleural âgé d'un an, seuls les éléments avirulents, dégénérés, ont pu se maintenir. C'est sous la forme lisse, « dysgonique », identique à celle de la souche originelle virulente, que ces éléments dégénérés se sont reproduits. Ce qui fait que nous possédons maintenant trois souches de bacilles tuberculeux bovins, dont deux d'aspect macroscopique et microscopique identique, la souche Taureau et la souche Taureau-un-an, la première très virulente et l'autre avirulente, et enfin la souche Taureau-un-an rugueuse, virulente, toutes trois issues de la même souche bovine originelle.

La communication suivante paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre *Mycobacterium***, par V. CHORINE et M<sup>lle</sup> J. RENAIS.

---

## ERRATUM

Communication J. BROWAEYS : *Essai de micromanipulation chimique colorimétrique (salicylate, sulfamides)*, 1946, 72, n<sup>os</sup> 1-2, p. 152, ligne 31 et p. 153, ligne 16 : au lieu de : mgs, lire : milligrammas (mγ).

Séance du 1<sup>er</sup> mars 1945.

Présidence de M. MAGROU.

## COMMUNICATIONS

### L'ACTION DISSEMBLABLE DES FACTEURS DE DIFFUSION A L'ÉGARD DE L'ÉPITHÉLIO- OU DU NEURO-VIRUS VACCINAL

par P. GASTINEL, R. FASQUELLE et P. ARNAUD.

L'accord est aujourd'hui fait sur les propriétés spéciales du virus vaccinal adapté à l'encéphale du lapin ; le neuro-vaccin, tel que M. Levaditi l'a obtenu, a une affinité toute particulière pour le cerveau de cet animal et cultive d'autre part essentiellement dans la partie profonde du revêtement cutané (1), tandis que le dermo-virus (ce dernier devant, à notre avis, plutôt être dénommé épithélio-virus) a une affinité prépondérante pour l'épiderme.

Par ailleurs, nous avons montré antérieurement (2) que neuro- et épithélio-virus offrent un comportement très différent, quand l'un ou l'autre est injecté au contact du système neuro-végétatif, le neuro-virus étant seul capable de déterminer la mort de l'animal avec virulence de l'encéphale.

Aujourd'hui, nous attirons l'attention sur une autre méthode de dissociation, à savoir la manière très différente dont agissent les facteurs de diffusion à l'égard du neuro- ou de l'épithélio-virus.

Déjà Duran-Reynals avait constaté dans ses premières expériences que le résultat obtenu par l'adjonction d'extrait testiculaire au virus vaccinal était plus accusé en utilisant une souche de provenance nerveuse (3).

Nous avons repris dans une série de recherches l'étude comparée des facteurs de diffusion sur l'un ou l'autre virus vaccinal en faisant varier les voies d'introduction des virus d'une part, du facteur de diffusion d'autre part.

Les facteurs de diffusion utilisés provenaient indistinctement de testicules de lapins ou de taureaux.

(1) LEVADITI et VOET, *Presse méd.*, 1937, 43.

(2) GASTINEL et FASQUELLE, ces *Annales*, 1942, 68, 249.

(3) DURAN-REYNALS, *J. exp. Med.*, 1929, 50, 327.

I. — *Virus introduits par voie épidermique (scarification ou grattage).*

Si le facteur de diffusion et les virus sont inoculés par voie épidermique (scarification ou grattage), le facteur est absolument inefficace pour l'un et l'autre virus, qui gardent leurs caractères respectifs sans que les lésions provoquées soient modifiées par l'adjonction d'extrait testiculaire.

Il en est de même encore lorsque le vaccin étant toujours déposé sur des scarifications cutanées, le facteur de diffusion est introduit par voie endoveineuse : aucune modification notable des lésions n'est observée sur les plaques inoculées.

II. — *Virus introduits par voie intradermique.*

Si facteur et virus sont introduits directement dans le derme apparaît au contraire avec la plus grande netteté une grande dissemblance dans le comportement des deux souches :

Avec l'épithélio-virus, on obtient une lésion de vaccine typique, de morphologie habituelle, mais ayant seulement des dimensions un peu plus étendues par rapport à la lésion déterminée par du vaccin seul, injecté à la même dose et sur le même animal ;

A l'opposé, le neuro-virus ainsi inoculé dans le derme avec adjonction d'extrait testiculaire donne une lésion d'une surface considérable, pouvant s'étendre sur plusieurs centimètres, offrant un processus de nécrose hémorragique susceptible de gagner une très large zone du flanc de l'animal ; souvent même, à la périphérie, peut être observé un essaimage de lésions plus réduites. Suivant les animaux, la lésion produite est de dix à cent fois plus grande que celle déterminée par l'injection témoin.

L'action obtenue par le facteur de diffusion présente sa plus grande netteté quand il est directement associé au virus dans une même injection intradermique ; cependant, si les injections sont faites séparément (virus en un point, extrait testiculaire dans une zone toute voisine), on observe aussi une extension de la lésion, extension toutefois beaucoup plus marquée quand elle est produite par le neuro-vaccin, que lorsqu'elle est due à l'épithélio-vaccin.

Si le facteur est introduit par voie endoveineuse, les deux souches de virus étant inoculées par voie intradermique, on note l'absence de toute modification apparente pour l'épithélio-virus, qui évolue selon son type normal, alors que le neuro-virus déposé dans le derme reçoit de l'injection intraveineuse de facteur une certaine action activante, qui augmente les dimensions de la lésion vaccinale ; toutefois, elle n'acquiert jamais les proportions géantes remarquées quand il y a association *in situ* du facteur et du virus.

De telles constatations ne sauraient surprendre en raison de nos connaissances actuelles (4, 5) sur le mode d'action des extraits testiculaires ; ils déterminent une modification de la perméabilité du tissu conjonctif, vraisemblablement par un phénomène d'ordre physico-

(4) CHAIN et DUTHIÉ, *Nature*, 1939, 58, 977.

(5) ARNAUD, *Thèse Paris*, 1944.

chimique, aboutissant à une manière de fluidification du gel fondamental (rôle probable, d'après Chain et Duthié d'un enzyme capable d'attaquer les constituants muco-polysaccharidiques du tissu conjonctif).

*En résumé*, il apparaît donc :

1° Que le facteur de diffusion n'agit essentiellement que lorsqu'il est introduit, en même temps que le virus, au même point que lui surtout, par injection intradermique ; il est sans effet, lorsque l'inoculation virulente est réalisée par scarification ou grattage.

2° Comme conséquence de cette action dermique du facteur de diffusion, il est naturel de constater que son effet se manifeste surtout à l'égard d'un virus qui possède de lui-même une affinité pour les couches profondes du derme, c'est-à-dire pour le neuro-vaccin ; on constate alors l'exagération d'un aspect lésionnel qui appartient en propre à ce virus.

3° Dès lors l'emploi du facteur de diffusion souligne à nouveau les propriétés dissemblables des deux variantes du virus vaccinal, selon leur affinité épidermotrope ou dermo-neurotrope.

*(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine.)*

## **DU COMPORTEMENT DES COBAYES TUBERCULEUX DÉSENSIBILISÉS A LA TUBERCULINE A L'ÉGARD DU PHÉNOMÈNE DE KOCH**

par P. GASTINEL et H. BROCARD.

Dans une précédente communication (1), nous avons montré que lorsqu'on répète les réinoculations dermiques de bacilles chez les cobayes tuberculeux, on n'obtient pas une réponse constante selon le type du phénomène de Koch. Des fluctuations peuvent se produire et, à certains moments, l'animal a une réaction à peu près nulle ; d'autres fois, il fait un abcès de constitution précoce, ou encore, associant abcès et réaction nécrotique, il répond par un phénomène mixte. Nous avons été amenés à considérer que, tandis que subsiste toujours l'immunité de surinfection, la sensibilité aux corps bacillaires ne persiste pas inchangée au cours de la maladie du cobaye.

On pouvait se demander ce que deviendrait la lésion locale de réinfection si, chez un cobaye tuberculeux, on fait disparaître par l'administration de doses élevées et répétées de tuberculine la sensibilité de l'animal à ce produit. Des investigations de cet ordre ont été effectuées par Boquet. Cet auteur, injectant 1 mg. de bacilles à des cobayes primo-infectés par une souche virulente et désensibilisés, observa un épaissement de 6 à 8 mm. centré par une petite tache violacée que remplaça ensuite une petite croûte, tandis que les animaux non

(1) GASTINEL et BROCARD, *Ces Annales*, 1945, 74, 240.



désensibilisés et réinfectés à la même dose faisaient un phénomène de Koch typique (2). Injectant d'autre part 0,0001 mg. de bacilles bovins à des cobayes primo-infectés par la souche R<sub>1</sub> de Trudeau et désensibilisés, il ne constata qu'une petite élevation ou même l'absence de toute réponse, tandis que les animaux non désensibilisés faisaient une papule œdémateuse nette (3). Par ailleurs, Saenz (4) injecta 0,0001 mg. de bacilles vivants à des cobayes rendus allergiques par injection de bacilles morts enrobés dans l'huile de vaseline et désensibilisés; il vit alors se produire un simple petit nodule, tandis que les animaux non désensibilisés constituaient une papule œdémateuse. Ainsi la lésion de réinfection dermique est beaucoup moins importante chez les animaux désensibilisés que chez ceux qui sont toujours allergiques; elle n'a pas le caractère œdémateux et nécrotique qui caractérise le phénomène de Koch.

Reprenant ces expériences, nous avons pratiqué des réinoculations répétées de bacilles et en même temps des épreuves tuberculiques, afin d'étudier ce que deviennent les lésions de réinoculation et parallèlement les réactions à la tuberculine lorsque s'épuise la désensibilisation artificielle.

Douze cobayes ont été infectés avec 0,1 mg. de bacilles humains injectés par voie sous-cutanée; trente-trois jours après, les animaux réagissaient positivement à la tuberculine. Ils ont reçu alors, le trente-huitième jour, une injection intradermique de 1 mg. de la même souche bacillaire (\*); tous ont réagi par un phénomène de Koch typique. Nous avons ensuite pratiqué, du quarantième au cinquante-cinquième jour, une désensibilisation de 10 d'entre eux par 10 injections de 2,5 cg. et 3 injections de 5 cg. de tuberculine, les 2 autres cobayes constituant les témoins. Un animal mourut au cours de ce traitement. Les 9 autres furent éprouvés le lendemain de la dernière injection de tuberculine, soit le cinquante-sixième jour, par l'injection intradermique habituelle de tuberculine: 1 n'était pas désensibilisé, 2 l'étaient incomplètement, les 6 autres étaient totalement désensibilisés. Le même jour fut pratiquée une réinjection de 1 mg. de bacilles. Enfin, le soixante-neuvième et le quatre-vingt-cinquième jour, soit quatorze et vingt-huit jours après la fin du traitement tuberculinique, on répéta les injections intradermiques de tuberculine et de bacilles. Nous indiquons dans le tableau suivant les réponses que nous avons obtenues chez les animaux d'expérience et aussi celles qu'ont donné les témoins éprouvés aux mêmes dates:

D'une façon générale, et cela même chez les témoins, les dernières réponses, tant à la tuberculine qu'aux batilles, avaient été atténuées, en raison sans doute de la cachexie avancée des animaux.

De ces constatations, il résulte les points suivants:

1° La désensibilisation des cobayes, qui rend sans effet l'injection intradermique de tuberculine, ne fait pas disparaître leur résistance à l'égard de la surinfection tuberculeuse. On sait d'ailleurs, comme

(2) A. BOQUET, *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **110**, 902.

(3) A. BOQUET, ces *Annales*, 1941, **66**, 32.

(4) SAENZ, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 219.

(\*) Cette dose, élevée par rapport à celle utilisée dans les derniers travaux rappelés ci-dessus, a été choisie pour se mettre dans des conditions favorables à l'obtention du phénomène de Koch typique.

COBAYES TRAITÉS			APRÈS LA FIN DU TRAITEMENT tuberculinique		
			1 jour	14 jours	28 jours
Dont la désensibilisation a échoué.	1	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	+	+	+
			Ph. de Koch.	Ph. de Koch.	Ph. de Koch.
Dont la désensibilisation a été incomplète.	1	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	±	±	±
			Abcès.	Ph. mixte.	Ph. de Koch.
	2	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	±	+	±
			Infiltration.	Ph. de Koch.	Abcès.
Dont la désensibilisation a été totale.	1	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	0	±	+
			Abcès.	Ph. mixte.	Ph. mixte.
	2	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	0	±	+
			Abcès.	Abcès.	Ph. de Koch.
	3	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	0	0	±
			0	Abcès.	Abcès.
	4	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	0	+	+
			Abcès.	Ph. mixte.	Ph. de Koch.
	5	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	0	0	±
			Abcès.	Abcès.	Abcès.
	6	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	0	±	+
			Abcès.	Ph. mixte.	Ph. de Koch.
COBAYES TÉMOINS			AUX MÊMES DATES		
	1	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	+	+	
			Ph. de Koch.	Ph. de Koch.	
	2 (1)	1 cg. tuberculine. 1 mg. B. K.	+	+	±
			Ph. mixte.	Ph. de Koch.	0

1) Cet animal témoin reproduit donc les fluctuations spontanées dans l'obtention du phénomène de Koch à des réinoculations successives que nous avons ultérieurement signalées.

l'ont montré Birkhaug (5), Saenz, Boquet, que la désensibilisation ne modifie pas le retard de la dispersion des bacilles de réinfection.

Le comportement des animaux sera différent selon les cas : tantôt le cobaye n'offre aucune réaction locale, il accuse une complète indifférence au germe nouvellement injecté dans le derme ; tantôt il présente un *petit abcès précoce*, contenant exclusivement des bacilles de Koch, survenant en quarante-huit heures, se terminant en cinq ou six jours après élimination du pus par cicatrisation complète : tous signes témoignant à la fois de la résistance de l'animal au bacille de nouvel apport et aussi d'un état particulier de réactivité, état que n'a pas fait disparaître la désensibilisation (cette modalité réactionnelle, jamais observée sur un animal neuf, est comparable à la réaction accélérée décrite par von Pirquet dans l'allergie vaccinale).

(5) BIRKHAUG, *Acta Tuberc. scand.*, 1937, 11, 25.

2° Dans aucun cas l'animal désensibilisé ne présente le phénomène de Koch lors de la réinoculation.

3° Lorsque la désensibilisation s'épuise et que réapparaît la réaction à la tuberculine, l'animal répond à l'injection du bacille, soit par l'abcès précoce, soit par le *phénomène mixte* tel que l'a décrit Bezançon avec de Serbonnes (formation abcédée et nécrotique). Quand la sensibilité tuberculinique est complètement revenue, nous avons constaté que l'animal réagit alors par le phénomène de Koch, parfois et plus exceptionnellement par le phénomène mixte.

Ainsi, ressort-il bien que deux éléments distincts, conjoints mais dissociables, entrent dans la constitution du phénomène de Koch, sensibilisation cutanée et résistance à la surinfection, sans qu'il soit possible d'attribuer à la seule réactivité allergique des téguments la défense à l'égard des germes nouvellement introduits.

Si la désensibilisation fait disparaître un des aspects du phénomène de Koch, par contre, en aucun cas, spontané ou expérimental, le fléchissement ou la disparition de la sensibilité tuberculinique n'entraîne une défaillance dans la résistance de l'animal à la surinfection.

(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine.)

## ACTION DES RAYONS X SUR LE VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE ET LA VACCINE

par P. BONÉT-MAURY et M. FRILLEY.

La méthode d'irradiation a donné avec les rayons X des résultats satisfaisants pour la mesure de la taille relative des bactériophages (1) ; avec les rayons  $\alpha$ , elle a permis de fixer correctement les dimensions des ultra-virus de plusieurs maladies animales (2) et notamment de la vaccine.

Nous apportons ici le résultat d'expériences poursuivies depuis trois ans sur la sensibilité aux rayons X de 2 virus animaux de tailles extrêmement différentes : la vaccine et la fièvre aphteuse dermatrope.

### Protocole expérimental :

L'irradiation est effectuée sous une épaisseur  $x = 4,3$  mm., avec un rayonnement X (K du Mo) correspondant à une longueur d'onde efficace de  $0,95 \text{ \AA}$  et à un coefficient d'absorption moyen  $\mu = 3,5 \text{ cm.}^{-1}$  par centimètre cube. La quantité d'énergie absorbée par la suspension de virus, exprimée en paires d'ions par centimètre cube, est calculée par la formule :

$$N = \frac{D_0 (1 - e^{-\mu x})}{\mu x} 1,6 \times 10^{-12} \text{ p. i. par centimètre cube.}$$

(1) WOLLMAN et LACASSAGNE, *Ces Annales*, 64, 45.

(2) P. BONÉT-MAURY, *J. Ch. Physique*, 1942, 39, 116.

où  $D_0$  est la dose en unités  $r$ , arrivant à la surface du virus et mesurée au moyen de la chambre absolue de A. Rogozinski ( $10^6 r = 0,83 \times 10^{18}$  p. i. par centimètre cube).

Pour la vaccine, nous avons utilisé une suspension au 1/10 dans l'eau physiologique, de cerveau de lapin, mort des suites d'une inoculation intracérébrale avec la souche neurotrope de la collection de C. Levaditi. L'activité de cette suspension, avant et après irradiation, a été déterminée avec R. Pérault, par inoculation des dilutions au 1/10 dans le derme du flanc d'un lapin, préalablement rasé. Chaque animal reçoit 24 inoculations de 1 c. c. réparties de façon rationnelle, pour éliminer les différences de sensibilité du derme suivant la place de l'inoculat, et comparer directement au témoin les résultats de chaque irradiation. Au bout de six jours, on relève le taux des inoculations positives, ainsi que leur diamètre et la place de la dilution virulente 50 p. 100 (D. V. 50) est déterminée (3). Le tableau 1 donne les résultats d'une expérience type et la figure 1 donne la courbe d'inactivation, résumant l'observation de 504 inoculations réparties sur 21 lapins.

TABLEAU I. (Expérience du 28 décembre 1943.)

		NUMÉRO DES LAPINS						TOTAL des inoculations positives
		80	81	82	34	41	70	
Témoin.	$10^{-4}$ . . .	+	+	+	+	+	+	12/12
	$10^{-5}$ . . .	+	+	0	0	+	+	8/12
	$10^{-6}$ . . .	0	0	0	0	0	0	0/12
$10^6 r$ .	$10^{-3}$ . . .	+	+	+	+	+	+	6/6
	$10^{-4}$ . . .	+	+	+	+	+	+	11/12
	$10^{-5}$ . . .	0	0	0	0	+	0	2/12
	$10^{-6}$ . . .	0	0	0	0	0	0	0/6
$2 \times 10^6 r$ .	$10^{-1}$ . . .	+	+	+	+	+	+	6/6
	$10^{-2}$ . . .	+	+	+	+	+	+	12/12
	$10^{-3}$ . . .	+	+	+	+	+	+	12/12
	$10^{-4}$ . . .	+	0	+	+	0	+	4/6
$3 \times 10^6 r$ .	$10^{-1}$ . . .	+	+	+	+	+	+	12/12
	$10^{-2}$ . . .	+	+	+	+	+	+	12/12

Les expériences sur la fièvre aphteuse ont été réalisées avec le précieux concours de M<sup>me</sup> Vaisman, qui s'est chargée de l'inoculation des cobayes. La suspension virulente est obtenue en broyant dans le sérum physiologique des aphtes, apparus dans le derme plantaire du cobaye, après inoculation de la souche dermatrope de fièvre aphteuse de la collection de C. Levaditi. Le titrage est effectué par la même

(3) P. BONÉT-MAURY, Irradiation et méthodes statistiques de titrage, dans *Traité des ultra-virus des maladies animales*, par LEVADITI, LÉPINE et VERGE, Maloine, Paris, 1943.



méthode statistique que celui de la vaccine, en relevant le taux d'inoculations positives, après inoculation des dilutions successives au 1/10 de la suspension initiale. Le tableau II correspond à une expérience type et la courbe de la figure 2 condense les résultats obtenus avec 120 cobayes, soit 240 inoculations.

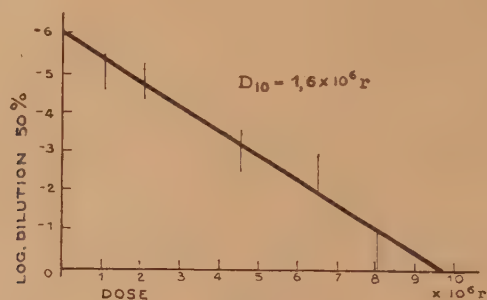


FIG. 1.

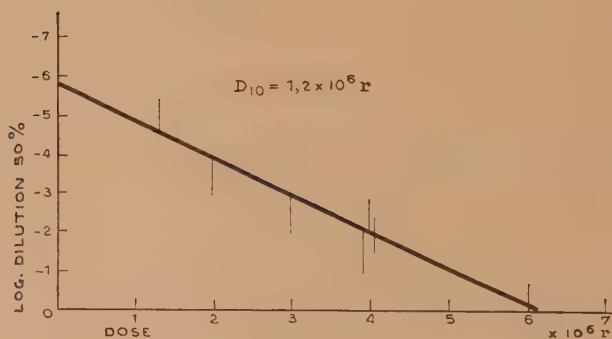


FIG. 2.

TABLEAU II. — Taux d'inoculations positives. (Expérience du 27 mai 1944.)

	DILUTION					
	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6
Témoin . . . . .	—	—	—	2/2	3/4	2/6
$1,4 \times 10^6 r$ . . . . .	—	—	—	4/4	6/6	4/6
$4 \times 10^6 r$ . . . . .	6/6	4/4	—	—	—	—

On remarque que les points expérimentaux des deux courbes se placent, compte tenu de l'écart expérimental, de façon acceptable

sur une droite, c'est-à-dire que les résultats sont compatibles avec une inactivation du virus par un seul choc, conformément à la théorie quantique.

*Taille et structure du virus de la fièvre aphteuse :*

Pour interpréter les données relatives à ce virus il est utile de les rapprocher d'une part de celles obtenues avec les rayons  $\alpha$  et d'autre part de l'inactivation du bactériophage  $\varphi$ -X-174 par les rayons X et  $\alpha$  (4). Le tableau III donne l'énergie (en paires d'ions par centimètre cube) nécessaire pour réduire le titre du virus à 10 p. 100 de sa valeur initiale (dose  $D_{10}$ ).

TABLEAU III.

VIRUS	IRRADIATION X	IRRADIATION $\alpha$	$\alpha/X$	DIAMÈTRE moyen par d'autres méthodes
Vaccine . . . . .	$1,32 \times 10^{18}$	$1,3 \times 10^{17}$	0,1	240 m $\mu$
Fièvre aphteuse .	$1 \times 10^{18}$	$6,0 \times 10^{18}$	6	20-30 m $\mu$
$\varphi$ -X-174 . . . . .	$1,9 \times 10^{18}$	$1,9 \times 10^{19}$	10	15 m $\mu$

La radiosensibilité en X de la fièvre aphteuse apparaît ainsi de peu supérieure à celle du bactériophage  $\varphi$ -X-174 dont les dimensions sont connues avec une bonne précision (5). Le calcul donne pour le volume radiosensible un diamètre :  $d = 17 \text{ m}\mu$  en prenant pour choc actif la création d'une paire d'ions et de  $d = 24,5 \text{ m}\mu$  en admettant que les paires d'ions sont produites par groupe de 3 en moyenne. Le diamètre de  $17 \text{ m}\mu$  correspond certainement à une valeur minima ; la valeur  $24,5$  reste en bon accord avec les données des autres méthodes.

On peut obtenir des résultats sur la structure de ce virus en comparant les données en X et  $\alpha$  du tableau III. En effet, on remarque que le rapport des énergies nécessaires pour inactiver le virus et le bactériophage avec ces deux rayonnements sont du même ordre (6 et 10). Ce comportement analogue incline à leur attribuer des structures du même type, c'est-à-dire une homogénéité du type macromolécule ou gène, traduite chez le bactériophage par la radiosensibilité uniforme de tout le corpuscule (5).

*Taille et structure de la vaccine :*

La courbe d'irradiation de ce virus met en évidence un fait inattendu ; malgré leur très grande différence de taille les deux virus ont des radiosensibilités du même ordre. Il apparaît même que le virus aphteux est inactivé par une dose ( $D_{10} = 1,2 \times 10^6 \text{ r}$ ) inférieure à celle de la vaccine ( $D_{10} = 1,6 \times 10^6 \text{ r}$ ), ce qui au regard de la théorie de l'impact semble à première vue paradoxal. Alors que l'irradiation  $\alpha$

(4) BULGAKOFF, FRILLEY et BONÉT-MAURY, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 438, 487 et 499.

(5) LÉPINE, GIUNTINI, BULGAKOFF et BONÉT-MAURY, *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 438, 728.

avait donné pour la vaccine, dès 1941, une taille correcte (240  $m\mu$ ), l'irradiation X donne des dimensions de peu inférieures à celles de la fièvre aphteuse.

Le calcul donne un diamètre :  $d = 15 m\mu$  (pour une paire d'ions active ou  $d = 21,5 m\mu$  pour des groupes de 3)

Comment expliquer ce résultat surprenant ? Deux hypothèses au moins peuvent être retenues ; elles supposent toutes deux une hétérogénéité de structure de la vaccine qui la différencie profondément du virus de la fièvre aphteuse, homogène vis-à-vis des rayonnements étudiés.

La première hypothèse, proposée par Lea et Salaman (6) pour interpréter leurs résultats de l'irradiation de la vaccine en X,  $\alpha$  et  $\gamma$ , attribue aux corpuscules virulents une structure telle que le volume sensible représente 1/200 du volume total et se trouve fractionné en 909 centres distincts. Ceci suggère évidemment un appareil nucléaire chromosomique, rapprochant le virus des bactéries.

Nous envisageons de notre côté, avec R. Latarjet, l'hypothèse suivante : l'élément radiosensible du virus vaccinal aurait des dimensions voisines de celles du corpuscule de fièvre aphteuse, soit 20  $m\mu$ . Ces éléments constituant les unités virulentes réelles, seraient agglomérés en particules de 240  $m\mu$  de diamètre (Micrographie électronique et centrifugation). La structure du virus serait analogue à celle que l'on observe à plus grande échelle dans le virus de la grasserie du ver à soie, dont les particules normales ont un diamètre de 5 à 7  $\mu$  et se désagrègent dans certaines conditions en corpuscules plus petits, conservant la virulence.

Mais comment expliquer que l'irradiation  $\alpha$  donne un volume sensible du même ordre que le volume total du corpuscule vaccinal ? On peut penser que la structure du virus permet par migration d'énergie l'inactivation de toute la masse du corpuscule par la traversée d'une seule particule  $\alpha$ . La migration d'énergie, du même type que celle observée dans la luminescence des cristaux, la formation de l'image latente photographique, etc., doit se produire d'ailleurs dans toute action biologique des rayons  $\alpha$  car le rapport des énergies X et  $\alpha$  produisant un effet biologique donné est très inférieur à celui qu'on pourrait calculer d'après l'espacement des paires d'ions (7).

Quoi qu'il en soit, ces résultats comme ceux de la micrographie électronique américaine (aspect de dé à jouer de la vaccine) et de l'analyse chimique amènent à attribuer au virus vaccinal une structure complexe, sur la nature exacte de laquelle nous ne sommes pas encore fixés, mais nettement différente de la structure homogène, sans doute macromoléculaire du virus de la fièvre aphteuse et du bactériophage  $\phi$ -X-174.

Si l'on rapproche nos conclusions de celles de Latarjet et Wahl (8) obtenues par des raisonnements analogues, sur la différence de structure des bactériophages  $C_{16}$  et  $S_{13}$ , inactivés par les rayons X et ultra-violet, s,

(6) LEA et SALAMAN, Ces auteurs ayant expérimenté dans des conditions très différentes (virus desséché) leurs résultats ne paraissent pas comparables directement aux nôtres. Il en est de même des expériences de Lacassagne et Nyka, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 1038.

(7) L'espacement moyen de deux paires d'ions est de l'ordre de 15  $m\mu$  pour le rayonnement K du Mo, tandis que cet intervalle est de l'ordre de 0,2  $m\mu$  pour une particule  $\alpha$ . Dans une sphère de 15  $m\mu$ , atteinte par une trajectoire X ou  $\alpha$ , il y a, en moyenne, production de 57 paires d'ions  $\alpha$  pour une paire X.

(8) LATARJET et WAHL, ces *Annales*, 1945, 71, 336.

on met mieux en évidence les ressources très particulières de la méthode d'irradiation lorsqu'on dispose des données relatives à l'action de rayonnements différents sur un même objet biologique.

(*Institut du Radium et Institut Alfred-Fournier.*)

## SUR L'UTILISATION PRATIQUE DES MICROMÉTHODES EN SÉROLOGIE

par R. LAPORTE et L. HARDRE DE LOOZE.

Les réactions utilisées en sérologie sont beaucoup plus qualitatives que quantitatives. Lorsqu'on les effectue, il importe de distribuer les réactifs dans des proportions déterminées, mais il serait illusoire de rechercher une précision extrême des mesures. Les substances employées dans ces réactions ne peuvent être obtenues, en effet, à l'état de pureté ; leur nature exacte est encore inconnue et leur activité inconstante. Aussi est-il relativement simple d'adapter les techniques sérologiques en micro-méthodes. La tendance actuelle de la sérologie pratique est de réduire de plus en plus les doses des réactifs, celles du sérum notamment.

C'est ainsi qu'en ce qui concerne le séro-diagnostic de la syphilis — application de beaucoup la plus importante des méthodes sérologiques — les quantités de sérum employées par les premières techniques (Bordet-Wassermann classique, réaction de Calmette-Massol) ont été considérablement réduites avec les techniques modernes. Les procédés de Debains ou de Demanche n'emploient en pratique que 0,10 c. c. de sérum au total ; ce sont donc déjà presque des micro-méthodes. Les réactions de floculation spécifiques ne nécessitent pas non plus de grandes quantités de sérum ; seule la réaction de Kahn en exige 0,45 c. c.

Or, la faiblesse encore notable de sensibilité de la plupart des techniques et une imperfection de la spécificité de certaines d'entre elles rendent souvent le diagnostic aléatoire si l'on ne pratique pas pour chaque sérum au moins 2 réactions : une d'hémolyse, type Bordet-Wassermann, et une floculation. Un séro-diagnostic de la syphilis exige donc, en moyenne, environ 1 c. c. de sérum, ce qui ne peut être obtenu dans la pratique qu'en procédant à une ponction veineuse. Cette nécessité entrave l'application du séro-diagnostic au dépistage systématique de l'infection dans de grandes collectivités. Pour atteindre ce but il nous faut des micro-méthodes précises, d'emploi facile, pouvant être effectuées avec très peu de sérum que l'on peut alors obtenir en prélevant du sang par simple piqûre des téguments. Les deux qualités indispensables que doivent posséder les micro-méthodes sont donc une grande simplicité de technique — condition formelle de leur diffusion — et une sûreté aussi grande que celle des macro-méthodes.

Les auteurs des différentes techniques utilisées dans les laboratoires de sérologie (Meinicke, Kahn, Hinton, Eagle, Kline) ont adapté leurs procédés aux micro-méthodes mais les solutions proposées sont compli-



quées ; elles nécessitent un matériel coûteux et difficile à réaliser, ce qui en contre-indique l'emploi pour le dépistage en grande série. Dans ces dernières années divers auteurs (Chediak, Ko-Ia-Guo, Demanche) ont proposé, pour le diagnostic de la syphilis, d'utiliser le sang desséché préalablement recueilli sur une lame de verre ou sur papier filtre. On effectue certaines réactions (Meinicke, Bordet-Wassermann) avec l'extrait aqueux du sang desséché comme avec le sérum. Ces micro-méthodes au sang sec, malgré leur simplicité et leur caractère apparemment pratique, n'ont pas donné les résultats attendus. Elles sont en effet trop peu sensibles et leur technique est particulièrement difficile, la présence d'hémoglobine gênant considérablement les lectures.

Il était donc indiqué de chercher à rendre pratiques les micro-méthodes au sérum. Nous pensons avoir atteint ce but en réduisant simplement suivant un rapport déterminé les doses de chacun des réactifs employés dans les techniques habituelles. Le problème à résoudre était de trouver un moyen pratique pour mesurer de très faibles quantités de liquides. Nous y sommes parvenus en procédant à la distribution des réactifs par micro-gouttes. Une pipette Pasteur, deux fois effilée et coupée ensuite de telle sorte que sa pointe ait un calibre permettant d'obtenir, avec une précision suffisante, XL gouttes au centimètre cube, suffit pour distribuer le sérum dans toutes les réactions. On peut ainsi effectuer le Bordet-Wassermann avec 0,05 c. c. de sérum (0,025 dans chacun des tubes ; tube de réaction et tube témoin) et cela dans les mêmes conditions qu'avec les techniques habituelles. Bien entendu les doses des autres réactifs sont réduites dans la même mesure que celles du sérum. On réalise ainsi en quelque sorte un demi-Wassermann. Les micro-pipettes au 1/40 sont très faciles à faire et avec un peu d'habitude on les obtient sans tâtonnement en nombre aussi grand qu'il est nécessaire ; elles sont munies d'une tétine en caoutchouc. On en prépare en outre de beaucoup plus fines donnant par exemple CC gouttes de suspension colloïdale d'un antigène alcoolique (type antigène de Kahn) au centimètre cube. Ce qui importe c'est de calibrer chaque pipette avec le réactif pour lequel on la destine. Les réactions sont effectuées dans des tubes à hémolyse, de diamètre plus étroit que ceux d'usage courant [5 à 7 mm. de diamètre intérieur] (1).

On opère les prélèvements de sang par une petite incision, avec un vaccinostyle, du lobule de l'oreille ; le sang est recueilli dans un micro-tube de 5 mm. de diamètre et de 50 mm. de long. 0,4 à 0,5 c. c. de sang sont largement suffisants pour procurer la quantité de sérum nécessaire à 2 réactions au moins. Les techniques qui nous ont donné les meilleurs résultats sont : le micro-Wassermann (adaptation des méthodes Debains, Demanche ou Kolmer, la réaction de Kline (cette réaction est déjà une micro-méthode, puisqu'une seule goutte de sérum suffit pour l'effectuer), le micro-Sachs-Witchsky (1/40 de centimètre cube de sérum), le micro-Meinicke (même dose de sérum). La réaction de

(1) Lorsqu'on a beaucoup de sérums à distribuer il est difficile d'avoir une pipette pour chaque sérum. L'expérience prouve qu'il n'y a pas d'inconvénient à utiliser la même pipette pour plusieurs sérums à condition de rincer trois fois au moins la pipette avec de l'eau physiologique entre chaque sérum. La présence d'une tétine facilite beaucoup cette opération et la rend très rapide.

Kahn peut être adaptée en micro-méthode, mais pour lui conserver ses caractères de sensibilité et de spécificité on doit l'effectuer en 3 tubes, ce qui ne peut pas être réalisé avec moins de 0,10 c. c. de sérum.

*En résumé*, l'emploi de micro-pipettes faciles à construire et donnant des micro-gouttes, de volume déterminé pour chaque réactif, est la solution que nous proposons pour transformer d'une manière très simple et pratique les techniques courantes de la sérologie en micro-techniques. Les résultats que nous avons obtenus en effectuant sur près d'un millier de sujets des examens comparés avec le sang pris à la veine (macro-techniques) et celui prélevé à l'oreille (micro-techniques) nous ont montré la concordance presque absolue des résultats obtenus dans les deux cas. Il semble donc que nous ayons dans les micro-méthodes au sérum un procédé simple et d'application pratique pour entreprendre de grandes enquêtes sérologiques.

*(Institut Alfred-Fournier, Laboratoire de Sérologie.)*

## **ESSAIS DE DIFFÉRENCIATION DES AGGLUTININES ANTI-MOUTON APPARUES AU COURS DE LA MONONUCLÉOSE INFECTIEUSE ET APRÈS SÉROTHÉRAPIE**

par SOHIER et L. GIRIER.

On savait que les agglutinines anti-mouton apparaissaient non seulement au cours de la mononucléose infectieuse, mais après injection de sérums divers, mais on pensait pouvoir les distinguer par leur comportement différent au cours d'épreuves d'absorption effectuées avec les globules rouges de bœuf et le rein de cobaye bouillis.

Or, récemment, M. Demanche a rapporté, et nous avons eu l'occasion de constater que dans certains cas les agglutinines élaborées après sérothérapie pouvaient avoir des caractères très comparables, voire même identiques à ceux de la M. I. (1), du moins en utilisant la technique actuellement adoptée en France (2). Etant donné l'importance dogmatique et pratique de telles constatations et les erreurs auxquelles elle risquerait de conduire, puisque la réaction d'agglutination de Paul-Bunnell-Davidsohn constitue un des éléments fondamentaux du diagnostic de la M. I. et a contribué à l'isolement de cette affection, qui selon toute vraisemblance est une adénolymphoïdite spécifique, nous avons cherché s'il était possible de caractériser les deux types d'agglutinines autrement que par leur comportement vis-à-vis des antigènes de bœuf et de cobaye.

Les résultats obtenus après de nombreux essais effectués avec le sang

(1) Lire M. I. pour mononucléose infectieuse ; R. A. pour réaction d'agglutination de Paul et Bunnell.

(2) Absorption effectuée en une heure à la température du laboratoire, une partie de sérum pur pour quatre parties d'antigène dilué à 20 p. 100.

de 103 sujets ayant reçu du sérum (soit équin : antidiphthérique, antitétanique, antigangréneux, soit de lapin : « anthema ») et au cours de 7 mononucléoses infectieuses seront rapportés brièvement.

En ne considérant comme réaction positive que les sérums agglutinant les hématies de mouton à un taux égal ou supérieur au 1/80 avec absorption de 100 p. 100 ou au minimum de 98 p. 100 des agglutinines par les hématies de bœuf et de 0 à 75 p. 100 au maximum par le rein de cobaye, nous n'avons constaté après sérothérapie que 3 R. A. positives, soit 2,9 p. 100.

Les épreuves d'absorption par les hématies de cheval fraîches ou cuites n'ont pas permis de différenciation. Si le rein de cheval bouilli absorbe les agglutinines anti-mouton apparues après sérothérapie et ne déplace pas ou très peu celles observées dans la M. I., il arrive que cette absence de déplacement s'observe aussi dans quelques rares cas où la R. A. apparue après injection de sérum est d'un type voisin de la M. I.

On pouvait penser après Davidsohn que des absorptions successives par le rein de cobaye permettraient de distinguer les deux variétés d'agglutinines, mais s'il est vrai que celles apparues après sérothérapie sont totalement enlevées par deux absorptions, même dans le cas de R. A. du type de la M. I. et si dans cette maladie elles ne sont habituellement pas déplacées par cette technique, il arrive que certains sérums de M. I. à taux d'agglutinines faibles se comportent au regard de cette épreuve comme ceux de sujets ayant subi une sérothérapie.

Certaines constatations de Stuart nous ont conduits à chercher les taux d'agglutination comparés pour les hématies de mouton et de lapin. Nous avons alors constaté que pour tous les sérums de M. I. le taux des agglutinines anti-lapin était dans la majorité des cas (6 cas sur 7) inférieur à celui des agglutinines anti-mouton ou tout au plus égal (1 cas sur 7). Par contre, après sérothérapie, le taux des agglutinines anti-lapin est très rarement égal (5 p. 100 des cas) et presque toujours notablement supérieur (95 p. 100 des cas) à celui des agglutinines anti-mouton (3). De toutes façons d'ailleurs, dans les R. A. post-sérothériques du type de celles de la M. I. qui, rappelons-le, sont rarement rencontrées (2,9 p. 100), il s'est toujours montré nettement supérieur.

Un fait également mérite d'être signalé. Lorsqu'on injecte du sérum à un sujet guéri d'une M. I. au cours de laquelle il avait présenté une R. A. positive avec agglutination des hématies de mouton plus forte que celle des globules rouges de lapin, on fait apparaître des agglutinines actives à la fois sur les hématies de mouton et de lapin, mais cette fois à des taux notablement plus élevés pour ces dernières que pour les globules rouges de mouton.

Il semble donc, sauf à trouver une technique meilleure, qu'il soit utile, avant d'interpréter le résultat d'une R. A., de savoir si le malade a reçu par voie parentérale une albumine hétérogène (équine en particulier) et il est prudent dans ce cas de compléter la R. A. par une épreuve comparée d'agglutination des hématies de lapin, ou, en son absence, de faire toutes réserves sur la signification du résultat.

(3) On observe parfois un phénomène de zone, l'agglutination des hématies de lapin étant nulle ou insignifiante pour des dilutions allant du 1/5 au 1/40 et apparaissant très intense pour des dilutions plus fortes. On devra en tenir compte lors de l'épreuve.

## RÉACTIONS LOCALES PRODUITES PAR LE BCG INOCULÉ PAR SCARIFICATIONS CHEZ LES MALADES TUBERCULEUX

par LUCIENNE CORRE.

Lorsque le BCG est introduit dans l'organisme soit par des piqûres cutanées multiples (méthode de S. R. Rosenthal), soit par des scarifications de la peau (méthode de Nègre et Bretey), chez le nouveau-né ainsi que chez l'enfant et l'adulte non encore tuberculisés et dont l'anergie a été mise en évidence par le caractère négatif d'une cuti-réaction à la tuberculine, on observe l'apparition, au niveau même des scarifications, de très petits nodules survenant dans un délai de huit jours à trois semaines et disparaissant en quelques semaines sans laisser de cicatrices.

Il nous a paru intéressant d'étudier les réactions locales provoquées par la même méthode appliquée à des malades adultes, tuberculeux ou non.

Dans toutes nos observations, nous avons utilisé le vaccin BCGSP préparé à l'Institut Pasteur, en suivant la technique habituelle et en pratiquant, avec ce vaccin, deux scarifications en forme de croix.

Dans ces conditions, voici les observations que nous avons recueillies :

I. La première série de nos recherches a été pratiquée chez 17 malades adultes, âgés de vingt à cinquante ans et présentant tous une tuberculose pulmonaire, soit évolutive en période fébrile, soit régressive, soit stabilisée sous l'influence d'un pneumothorax. Certains de ces malades présentaient une tuberculose de forme fibreuse, d'autres une tuberculose de forme ulcéro-caséuse ; d'autres enfin, une primo-infection tuberculeuse, dont un érythème noueux. Chez tous ces malades, une cuti-réaction à la tuberculine pratiquée les jours précédents s'était révélée positive, avec une intensité moyenne (+) ; un seul malade, porteur de tuberculose fibreuse torpide, présentait une cuti-réaction à la tuberculine fortement positive (+ +).

Les scarifications au BCG S.P. ont entraîné chez tous ces malades une réaction locale qui a évolué de façon à peu près identique, présentant seulement des différences dans l'intensité.

Tout d'abord, contrairement à ce qui se passe chez le sujet neuf, la réaction est apparue très précocement. Après vingt-quatre à quarante-huit heures, s'est développée, au niveau et autour de la scarification, une papule rouge, arrondie, infiltrant la peau. Au troisième jour, s'est constitué, dans certains cas, un petit nodule ; et même, chez 4 de nos malades, on a vu se former, dès ce troisième jour, une véritable pustule. Chez 5 autres malades, le pus n'a fait son apparition franche que vers le cinquième jour, date à laquelle en général, on note le maximum de la réaction. D'abord contenue sous une mince pellicule, cette goutte-



lette de pus sourd bientôt lorsque se rompt cette enveloppe. L'intensité de la réaction ne semble pas être en rapport avec la forme clinique de tuberculose présentée par les malades.

A partir du cinquième ou sixième jour, la phase de régression a commencé et, dans la plupart des cas, on pouvait déjà noter, vers le septième jour, un début de cicatrisation ; la pustule, quand il en existe, se flétrit ; une croûte se forme, gardant souvent la disposition en croix des scarifications, toujours entourée d'une aréole encore rouge, plus ou moins étendue, mais ne dépassant pas 3 à 4 millimètres.

Durant la deuxième semaine, la croûte s'affaisse progressivement en diminuant de volume et, vers la fin de la troisième semaine, on note le plus souvent l'existence d'une cicatrice gaufrée et rouge, conservant sa forme de croix.

Pendant toute l'évolution de ces phénomènes locaux, les malades n'accusent aucun trouble général ; en particulier, on n'observe aucune modification de la courbe thermique ; mais au cours des premières journées, les malades se plaignent d'une légère douleur locale.

En résumé, cette première série de malades tuberculeux nous a permis de constater que la scarification de la peau au BCG donnait lieu à une réaction locale précoce et importante. Quelques faits particuliers sont à signaler : la réaction la plus importante a été observée chez le tuberculeux pulmonaire fibreux dont la réaction à la tuberculine était également la plus intense (+ +). Chez ce malade, un examen du pus prélevé au troisième jour, sous la mince pellicule qui le recouvrait, a montré, au milieu de nombreux polynucléaires altérés, l'existence de rares bacilles de Koch. Enfin, notons que chez quelques malades, la cuti-réaction à la tuberculine renouvelée quelques semaines après les scarifications au BCG n'a montré aucune modification de ses caractères précédents.

II. Parallèlement, nos épreuves ont porté sur une deuxième série de malades adultes, porteurs de tuberculose pulmonaire très évolutive, arrivée à la phase terminale et dont la cuti-réaction à la tuberculine était négative (—) ou tout au moins très faiblement positive ( $\pm$ ). Or, chez tous ces malades, aucune réaction locale n'était apparue au troisième jour de la scarification ; tout au plus, pouvait-on noter une très infime rougeur chez 3 d'entre eux ; rien de plus n'apparut les jours suivants, sauf chez une seule malade qui présenta, vers le dixième jour, une petite élévation, en regard de la scarification, contenant des traces de pus. Une croûte d'aspect cicatriciel apparut vers la troisième semaine.

III. Il nous a paru intéressant d'observer, chez une troisième série de malades, la réaction locale consécutive aux scarifications au BCG lorsque cette épreuve est appliquée, non plus à des tuberculeux évolutifs, mais à des malades hospitalisés pour tout autre affection.

C'est ainsi que furent observés en particulier deux malades atteints : l'un de cancer du poumon, l'autre d'abcès du poumon. Notons que ces deux malades avaient une cuti-réaction à la tuberculine négative. Les scarifications au BCG ne donnèrent chez eux aucune réaction durant les premiers jours, mais, d'une façon retardée, apparut vers

le septième jour une papule rouge dont le maximum ne fut atteint que vers le douzième jour sous forme d'un petit nodule rouge qui commença à se cicatriser vers le quinzième-vingtième jour. Il est à noter d'ailleurs que, chez ces deux malades, la cuti-réaction à la tuberculine renouvelée quelques semaines plus tard se révéla légèrement positive.

Par contre, 2 autres malades porteurs : l'un d'un cancer du larynx, l'autre de rhumatisme chronique et dont la cuti-réaction était également négative, réagirent aux scarifications par BCG dans les délais habituels des malades tuberculeux, mais d'une façon minime : une papule rouge au troisième jour.

La même épreuve fut encore appliquée à d'autres malades divers, dont les cuti-réactions à la tuberculine étaient cette fois positives : diabète insipides, néphrite chez un tuberculeux osseux, tumeur bronchique, etc. Ici les réactions provoquées par les scarifications au BCG furent sensiblement égales à celles des malades tuberculeux de la première série, avec maximum de la réaction vers le troisième-quatrième jour. Il faut signaler particulièrement l'importance extrême de la réaction chez une malade qui avait d'ailleurs présenté auparavant une cuti-réaction à la tuberculine très intense (+++). Très rapidement après la scarification au BCG, cette malade présenta une réaction très vive, dont le maximum fut noté au troisième jour avec escarre, véritable perte de substance, grande quantité de pus, laissant après elle une grosse croûte pendant plusieurs semaines.

IV. Chez une dernière série de malades, nous avons recherché si les réactions aux scarifications faites avec du BCG chauffé une demi-heure à 80° étaient les mêmes que celles produites par les bacilles vivants. L'épreuve a été pratiquée chez 12 malades divers : tuberculeux stabilisés ou très évolutifs, primo-infection tuberculeuse, affections diverses non tuberculeuses.

Parmi ces malades, 10 avaient auparavant présenté une cuti-réaction à la tuberculine positive. Chez eux, l'évolution de la réaction au BCG tué est resté, en général, parallèle à la réaction produite, dans les mêmes conditions, chez les malades précédents, au moyen de bacilles vivants : début précoce, maximum au cinquième-sixième jour ; début de cicatrisation au dixième jour ; cependant l'intensité est peut-être restée, en général, un peu moindre. Une pustule a été observée dans deux cas seulement ; le pus prélevé n'a montré que des polynucléaires altérés, sans bacilles de Koch visibles.

Les deux autres malades, tuberculeux très évolutifs, à cuti-réaction négative, n'ont donné également aucune réaction aux scarifications par les bacilles tuberculeux tués.

V. Des observations recueillies chez ces quatre séries de malades, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° D'une manière générale, la réaction au BCG S.P. vivant ou tué, est parallèle à la cuti-réaction à la tuberculine, mais elle est beaucoup plus intense que celle-ci ; notamment, elle provoque fréquemment de la suppuration ; ce qu'on n'observe jamais à la suite d'une cuti-réaction à la tuberculine.

2° Contrairement à ce qui se passe chez les sujets neufs, les scarifications au BCG entraînent une réaction beaucoup plus précoce et bien plus importante chez les sujets tuberculisés.

3° Enfin, chez certains malades, non tuberculeux, la réaction est peut-être retardée, moins intense, intermédiaire entre celle des tuberculeux et celle des sujets neufs.

(Services de M. le Dr Kourilsky, Hôpital Foch, Suresnes  
et de M. A. Boquet, Institut Pasteur.)

La communication suivante paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Fréquence de la lysogénéité et moindre fréquence de la lyso-sensibilité parmi les bacilles paratyphiques B**, par P. NICOLLE, J. GRABAR et P. GIBERT.

### Séance du 5 avril 1945.

PRÉSIDENCE DE M. NÈGRE.

### COMMUNICATIONS

#### RECHERCHES SUR LES CARACTÈRES CULTURAUX ET BIOCHIMIQUES DE *PLECTRIDIVM Saprogenes*

par A. R. PRÉVOT et M. WEISLITZ.

En 1904, dans son étude sur la biologie de la putréfaction, G. Salus (1), décrit une espèce anaérobie putride non protéolytique, isolée de la viande putréfiée, ne liquéfiant que lentement la gélatine, sous le nom de *B. saprogenes carnis*. Bien que cette description soit très courte et tout juste suffisante pour caractériser une espèce, elle a été retenue par l'un de nous (2) dans sa classification des anaérobies sous le nom de *Plectridium saprogenes*, ceci afin de rendre sa dési-

(1) G. SALUS. *Arch. Hyg.*, 1904, **51**, 97.

(2) A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 1 vol. Masson, 1940.

gnation conforme à la nomenclature binominale et pour la situer exactement dans le genre auquel elle appartient : elle possède en effet les trois caractères du genre *Plectridium* : spores terminales, mobilité, positivité du Gram. Cette espèce ne semble pas avoir été retrouvée depuis sa description et n'a donné lieu, à notre connaissance, à aucune recherche depuis 1904. Nous avons pu en faire l'étude grâce à la souche « Fd I » isolée il y a quinze ans de la flore d'une fermentation butyrique industrielle tournée au putride et entretenue depuis cette époque dans notre collection. Ceci indique tout d'abord la longévité remarquable de cette espèce. Sa thermorésistance est de deux minutes à 100°. Malgré sa mobilité évidente et très marquée, les colonies en gélose profonde sont nettement lenticulaires, ce qui indique que cet anaérobie n'attaque pas les galactanes (3) ; mais le dégagement gazeux y est abondant. Le pouvoir réducteur est très marqué : la phénosafranine et le rouge neutre sont virés en culture de façon irréversible ; la safranine est virée de façon temporaire ; ceci indique que le rH descend d'abord légèrement au-dessous de 2,5, puis remonte et reste compris entre 2,5 et 3,1. Le nitrate de sodium n'est pas réduit en nitrite. Les glucides suivants sont activement fermentés : glucose, lévulose, maltose, galactose, saccharose, lactose, arabinose, xylose, sorbite, dulcité, inuline et amidon ; la glycérine et la mannite le sont légèrement. La gélatine est lentement liquéfiée et ne perd la propriété de se recoaguler qu'au sixième jour d'étuve. Le lait est coagulé en quarante-huit heures et ne subit pas d'autres modifications ultérieures. Le blanc d'œuf coagulé, le sérum coagulé, la fibrine, la cervelle ne sont pas attaqués. Le cube de foie immergé dans le bouillon glucosé noircit de façon marquée. Le bouillon glucosé est fortement troublé, dégage beaucoup de gaz et répand une odeur putride très marquée due en partie à une petite quantité de SH<sup>2</sup>. A la fin de la fermentation, qui dure une huitaine de jours, le pH est de 4,4 ; l'acidité volatile totale est de 0,165 g. pour 100 c. c. ; la quantité d'NH<sup>3</sup> est de 0,047 g. pour 100 c. c. de culture. Parmi les produits volatils on trouve des traces d'alcool et d'aldéhyde, mais ni cétone, ni amine volatile. On ne trouve pas non plus d'acétylméthylcarbinol dans 100 c. c. de culture. Les acides volatils recueillis sont l'acide acétique et l'acide butyrique dont le rapport quantitatif est  $\frac{B}{A} = \frac{3}{2}$ . On trouve aussi

une notable quantité d'acide lactique. Il ne se produit pas de corps à fonction phénolique, en particulier ni indol, ni scatol. Le pouvoir pathogène de cette espèce est nul ; elle ne produit ni toxine, ni hémolyse. C'est probablement un hôte des sols arables et de l'intestin des bovidés.

L'étude biochimique de cette espèce pose à nouveau un problème souvent rencontré dans l'étude des anaérobies. C'est celui de la putréfaction sans protéolyse. Ce germe est en effet incapable d'attaquer les protéines. C'est un peptolytique, gélatinolytique, glucidolytique ; la putréfaction qu'il provoque est celle des peptones et l'odeur fétide qu'il en dégage n'est pas explicable par la petite quantité d'SH<sup>2</sup> qu'il



produit. Or, en dehors de ce dégagement sulfhydrique, il ne donne aucun des catabolites fétides connus tel que scatol, amines volatiles, etc. Il y a là une lacune dans la connaissance des processus de putréfaction et nous signalons l'intérêt qu'il y aurait à rechercher la nature des produits fétides des anaérobies non protéolytiques, car cette connaissance pourrait expliquer le mécanisme intime de ces processus.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

## ENTRETIEN D'UNE SOUCHE DE VIRUS POLIOMYÉLITIQUE ADAPTÉ A LA SOURIS BLANCHE (SOUCHE LANSING)

par J. VIEUCHANGE.

A la suite de l'adaptation par Armstrong d'un virus poliomyélitique (souche Lansing) au rat du coton (1) (*Sigmodon hispidus hispidus*), puis à la souris blanche (2), l'étude expérimentale de cette souche a été poursuivie simultanément en France par C. Levaditi (3) et G. J. Stefanopoulo (4). Les observations faites par Armstrong, sur la souris, ont été, dans l'ensemble, pleinement confirmées par ces auteurs. Ceux-ci ont, en particulier, bien mis en évidence deux faits importants :

1° L'irrégularité de la période d'incubation de la maladie expérimentale de la souris : cette période pouvant varier de deux à cent cinq jours ;

2° L'absence fréquente de paralysies : la mort des animaux pouvant survenir sans qu'on ait pu observer de signes prémonitoires bien caractérisés.

Toutefois, alors qu'Armstrong note, à la suite des passages sur les souris, une augmentation de la proportion des animaux paralysés, C. Levaditi et G. J. Stefanopoulo ont observé, au cours de leurs essais, des variations importantes du pouvoir pathogène. C. Levaditi a signalé l'allongement de la période moyenne d'incubation (12,7 jours pour les souris du premier passage, et 24,6 jours pour celles du septième passage) et une certaine augmentation de la fréquence des survies (de 16 à 43 p. 100 de survies après le troisième passage). Il en conclut à l'atténuation de la virulence de la souche.

Grâce à l'obligeance de M. C. Levaditi (5), qui a mis à notre disposition des échantillons de virus-souris en novembre 1943, nous avons

(1) CH. ARMSTRONG. *Publ. Health Rep.*, 1939, **54**, 1719.

(2) CH. ARMSTRONG. *Publ. Health Rep.*, 1939, **54**, 2302.

(3) C. LEVADITI. *Bull. Acad. Méd.*, 1941, **124**, 418 ; 1941, **125**, 285 ; 1941, **125**, 392 ; 1942, **126**, 76 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 417.

(4) G. J. STEFANOPOULO, S. DUVOLON et J. ETÉVÉ. *Ces Annales*, 1942, **68**, 343.

(5) Nous prions M. LEVADITI de vouloir bien agréer nos plus vifs remerciements.

eu la possibilité d'étudier cette souche et de confronter nos résultats avec ceux des auteurs précédents.

*Technique.* — Pour les passages ordinaires, on utilise une suspension de plusieurs fragments étagés du névraxe (frais ou conservés en glycérine) provenant d'une ou plusieurs souris sacrifiées paralysées ou mortes après avoir présenté des signes de paralysie et pour lesquelles l'examen histologique du névraxe a révélé l'existence de lésions poliomyélitiques. L'utilisation de fragments du névraxe pour les passages, la conservation du virus en glycérine, la fixation de divers niveaux pour examen histologique ont pour conséquence le morcellement du névraxe en de nombreux fragments. Aussi, pour les passages, n'utilise-t-on de la substance nerveuse de chaque souris qu'une quantité dont le poids ne dépasse pas, en moyenne, 0,15 g.

Les inoculations sont faites par voie intracérébrale, à la dose de 3/100 de centimètre cube. Les suspensions sont préparées au taux de 1 p. 20 dans l'eau physiologique. En effet, selon les expériences de C. Levaditi (6), cette concentration est aussi active que la concentration de 1 p. 10 ; par contre, le pouvoir pathogène baisse sensiblement à la concentration de 1 p. 50. Comme nous avons précédemment observé pour le neurovaccin (7) (cerveau de lapin infecté ou mort de neurovaccin) qu'à la concentration de 1 p. 10 on n'est pas absolument à l'abri de l'effet de substances capables de modifier l'action pathogène du virus, il nous a semblé préférable, en raisonnant par analogie, d'écarter, pour le virus Lansing, la concentration de 1 p. 10 utilisée par C. Levaditi.

La longue durée fréquente de la période d'incubation, l'absence de paralysies chez de nombreux animaux entraînent pour conséquences : 1° l'observation des animaux pendant un temps au moins égal à la plus longue période d'incubation rapportée par les auteurs, soit cent cinq jours, et 2° la recherche systématique des lésions histologiques permettant de poser le diagnostic de l'infection, chez toutes les souris qui ont succombé pendant la période d'observation, qu'elles aient ou non présenté des paralysies.

*Statistique générale.* — Pour les seuls passages, il a été inoculé 115 souris avec 97 résultats positifs, soit 84 p. 100. La durée d'incubation a présenté des variations importantes, oscillant de deux à quatre-vingt-douze jours (v. *graphique*), avec deux périodes de fréquence maximum, la première autour du quatrième jour, la seconde autour du quatorzième jour.

Il a été observé des paralysies chez 32 animaux. 65 souris sont mortes sans signes paralytiques précédant la mort, mais avec des lésions plus ou moins intenses de poliomyélite décelables à l'examen histologique du névraxe. 18 animaux ont résisté. Pour ces derniers, on a pratiqué soit l'examen anatomo-pathologique, sans trouver les lésions caractéristiques de la poliomyélite, soit l'inoculation d'épreuve : les souris qui ont reçu cette seconde inoculation ne possédaient pas, en règle, d'immunité. (Treizième passage : 4 souris survivent à l'inoculation du virus de passage ; éprouvées le soixante-quatorzième jour après la primo-inocu-

(6) C. LEVADITI. *Bull. Acad. Méd.*, 1941, **125**, 392.

(7) J. VIEUCHANGE. *Bull. Acad. Méd.*, 1940, **123**, 101.

## Entretien d'une souche de virus poliomyélique (souche Lansing) sur la souris. Résultats de 17 passages.

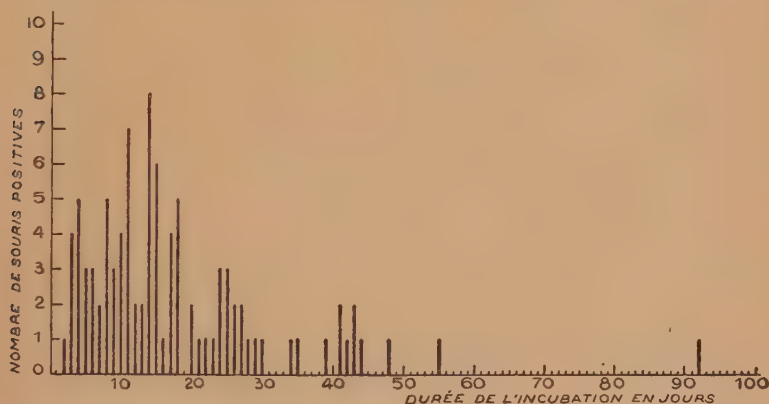
PASSAGES	DATE de l'inoculation	MATÉRIEL inoculé	NUMÉRO des souris	INCUBATION des souris en jours	NOMBRE de souris inoculées	ANIMAUX positifs	ANIMAUX paralysés	ANIMAUX mégafils	DURÉE de la période d'incubation en jours (1)
1. . . . .	29 novembre 1943.	Glycérine.	742 p <sup>a</sup>		14	12	(4)	2	13, 14, 15, 24, 30
2. . . . .	14 décembre 1943.	Frais.	752 p <sup>a</sup>						41, 41, 42, 43, 47, 92
3. . . . .	14 décembre 1943.	Frais.	S. 1	43	5	5	—	—	3, 3, 4, 5, 18
4. . . . .	14 décembre 1943.	Frais.	S. 2	14	5	4	—	1	3, 3, 4, 5, 7, 9
5. . . . .	24 décembre 1943.	Glycérine.	S. 3	15	5	5	(4)	—	3, 4, 4, 6, 10
6. . . . .	24 décembre 1943.	Frais.	S. 25	3	5	5	(4)	—	4, 5, 10, 10, 12
7. . . . .	24 décembre 1943.	Frais.	S. 22	9	5	5	—	—	8, 8, 8, 9, 43
8. . . . .	8 janvier 1944.	Frais.	S. 4	24	5	5	(4)	—	2, 8, 13, 14, 17
9. . . . .	7 février 1944.	Glycérine.	S. 49	14	5	5	(3)	—	5, 10, 11, 14, 48
10. . . . .	21 février 1944.	Glycérine.	742 p <sup>a</sup>		8	3	—	5	14, 14, 24
11. . . . .	21 février 1944.	Glycérine.	S. 47	8	40	40	(2)	—	7, 9, 11, 14, 14, 14, 17, 23, 24, 26
12. . . . .	7 mars 1944.	Frais.	S. 48	14	7	7	(5)	—	14, 11, 11, 48, 27, 27, 39
13. . . . .	17 mars 1944.	Frais.	S. 119	14	6	6	(2)	—	11, 14, 15, 15, 15, 16
14. . . . .	17 mars 1944.	Frais.	S. 133	11	8	4	(2)	4	22, 28, 29, 35
15. . . . .	14 avril 1944.	Glycérine.	S. 133	11	8	8	(2)	—	8, 12, 15, 17, 17, 21, 26, 44
16. . . . .	26 avril 1944.	Frais.	S. 142	11	9	8	(2)	1	18, 19, 18, 20, 20, 25, 34, 59
17. . . . .	40 mai 1944.	Glycérine.	S. 156 bis	22	5	0	—	—	
	27 juin 1944.	Glycérine.	S. 152	14	8	8	(2)	—	
	3 août 1944.	Glycérine.	S. 55	14	5	5	(4)	—	
		Glycérine.	S. 135	41					
		Glycérine.	S. 152	22					
		Glycérine.	S. 82	20					
		Glycérine.	S. 152	22					
		Glycérine.	S. 208	25					
Totaux des animaux . . . . .					115	97	32	18	6, 6, 15, 25, 25

(1) Les chiffres en caractères gras désignent les délais d'apparition des paralysies.

lation, toutes meurent du troisième au vingt-septième jour avec des lésions de poliomyélite à l'examen microscopique du névraxe. Quinzième passage : 5 souris survivent à la première inoculation ; éprouvées le cent quarante-quatrième jour après la primo-inoculation, 4 meurent du neuvième au vingt-cinquième jour, avec des lésions histologiques positives.)

*Résultats et conclusions.* — Deux groupes de constatations ressortent des faits observés au cours de l'entretien de cette souche de virus poliomyélitique, sur la souris.

D'une part, pour chaque série d'animaux inoculés, on note, à l'échelle individuelle, des variations du pouvoir pathogène se traduisant : 1° par l'irrégularité de la période d'incubation qui varie de deux



Entretien d'une souche de virus poliomyélitique (souche Lansing) sur la souris  
Délais d'incubation.

à quatre-vingt-douze jours ; 2° par la diversité du tableau clinique (absence fréquente des paralysies ; variations du siège des paralysies). Différences telles que l'on peut dire qu'il n'y a pas une maladie expérimentale typique de la souris, à la suite de l'inoculation de virus poliomyélitique souche Lansing, mais de très nombreuses formes cliniques.

D'autre part, les variations du pouvoir pathogène ne sont pas moins évidentes à l'échelle statistique (v. tableau) : on enregistre un pourcentage de résultats positifs très variable d'un essai à un autre. En effet, on observe parfois une chute de virulence brusque et nullement progressive. Parfois au contraire, à la suite de certains passages, il semble que la souche récupère un haut degré de virulence. Ces variations du pouvoir pathogène ne semblent donc pas devoir être interprétées comme une diminution de virulence de la souche, mais paraissent dues à des facteurs sur la nature desquels nous nous proposons de revenir.

(Institut Pasteur. Service des Virus.)



La communication suivante paraîtra en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

De l'activité inhibitrice des représentants de quelques séries chimiques sur la pousse du bacille de Koch, par J.-P. JOUIN et BUU-HOI.

---

Séance du 3 mai 1945.

Présidence de M. NÈGRE.

---

### COMMUNICATIONS

## ACTION DE CERTAINS CORPS SUR LA FERMENTATION DE QUELQUES BACTÉRIES ANAÉROBIES.

### I. COLORANTS. — II. VITAMINES. — III. MÉTAUX.

par A. R. PRÉVOT et J. TAFFANEL.

Quand on opère dans les mêmes conditions de milieu et de température, par exemple : bouillon VF glucosé à 1 p. 100, contenu en fioles d'Erlenmayer et placé à 37°, le type fermentaire des anaérobies est un caractère très stable qui peut être considéré comme l'un des meilleurs pour la détermination de l'espèce. Nous avons dénombré jusqu'ici 13 types principaux constitués par les mélanges d'acides volatils et 8 types dérivés dus à la coexistence d'acides fixes, soit 21 types fermentaires dont la mention nous paraît indispensable dans la fiche minimum de chaque anaérobie. Nous avons voulu voir si le type fermentaire des anaérobies était susceptible de subir des variations de degré ou de nature quand on soumet soit la souche, soit directement la fermentation, à l'action d'agents chimiques considérés comme pouvant agir sur les bactéries ou sur leurs processus vitaux.

I. *Colorants*. — Nous avons étudié l'action de quelques colorants indicateurs de pH : cristal violet, violet de crésyl, vert janus, fuchsine, safranine, phénosafranine et rouge neutre pris chacun à dose sub-léthale et agissant, soit sur la souche par passage en série sur bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000 contenu en tubes de Hall additionné du colorant en question, soit directement sur la fermentation en fiole d'Erlenmayer. Tous ces colorants sont rapidement réduits par les

anaérobies étudiés : *W. perfringens*, *Cl. fallax* et *Cl. pseudo-fallax*, *Cl. histolyticum*, *E. nitritogenes*, *R. ramosum*, *F. girans* et *F. biacutus*. Ils fonctionnent donc, dans les processus fermentaires, comme accepteurs d'hydrogène, et ce faisant, entraînent des déviations aboutissant le plus souvent à des modifications de degré et de nature du type fermentaire, modifications qui ont été le plus souvent réversibles par suppression de l'action perturbatrice. Mais l'action des colorants sur les souches a pu, dans certains cas, créer de véritables modifications irréversibles, stables, qui nous apparaissent comme des variétés biochimiques nouvelles. Par exemple, après 20 passages, le cristal violet change le type acéto-butyrique de *W. perfringens* en type formo-butyrique, et après 40 passages, en type formo-propionique ; mais par repiquage sur bouillon normal la souche momentanément perturbée reprend son type fermentaire normal. Par contre, le même colorant transforme le type fermentaire de *Cl. fallax* (normalement valéro-acétique) et de *E. nitritogenes* (normalement butyro-propionique) en ferments acéto-butyriques stables, irréversibles.

Nous avons constaté que le type fermentaire qui se trouve le plus résistant aux actions de déviation dues aux colorants, est le type acéto-butyrique, et que la modification la plus fréquente obtenue à partir des autres types (sauf à partir du type acéto-formique) est aussi l'apparition du couple acéto-butyrique. Or, il se trouve que dans la nature, le type le plus fréquent est justement le type acéto-butyrique que nous avons rencontré dans 35 p. 100 des cas. Le type fermentaire le plus stable après le type acéto-butyrique est le type acéto-formique. Au contraire, les types à acides propionique et valérianique sont très instables, et l'acide qui disparaît le plus facilement des fermentations est l'acide valérianique. En dehors de ces actions de déviation passagères ou définitives, nous avons constaté des actions de stimulation ou d'inhibition de l'intensité de la fermentation se traduisant par des augmentations ou des diminutions très notables de l'acidité volatile totale, survenant parfois même en dehors de toute modification du type fermentaire. Ainsi le rouge neutre triple le rendement acéto-butyrique de *W. perfringens*, sextuple celui de *Cl. fallax* (avec déviation du type valéro-acétique en acéto-butyrique), quintuple celui de *Cl. pseudo-fallax* (avec déviation semblable), double celui de *Cl. histolyticum*. Le violet de crésyl triple le rendement acéto-butyrique de *W. perfringens*, double celui de *E. nitritogenes*, sextuple celui de *Cl. fallax*, quintuple celui de *Cl. pseudo-fallax*, triple celui de *Cl. histolyticum*. A côté de ces deux colorants très stimulants, le vert janus est presque indifférent vis-à-vis du *perfringens*, alors qu'il fait baisser l'acidité volatile totale de *R. ramosum* et qu'il quadruple le rendement de *Cl. fallax* et de *Cl. histolyticum*, la fuchsine ne faisant que tripler le rendement de ces deux microbes, alors qu'elle diminue nettement celui de *Fusiformis biacutus*.

En général les stimulations observées sont maximum au vingtième passage et diminuent ensuite jusqu'au quarantième.

II. Vitamines. — Nous avons étudié l'action de 4 vitamines hydro-solubles : B<sub>1</sub>, C, H' et PP, soit par action sur la souche par repiquage quotidien en tube de Hall additionné de 1 mg. de la vitamine en question, soit par action directe sur la fermentation par addition de 15 mg.

au bouillon glucosé à 1 p. 100 d'une fiole d'Erlenmayer de capacité utile égale à 750 c. c.

Ici encore nous avons constaté des variations importantes du type fermentaire, ainsi que des modifications du rendement en acidité volatile totale. Les variations du type fermentaire ne se produisent pas toujours dans le même sens pour une même vitamine et pour une même espèce, ce qui indique une perturbation brutale ne frappant pas toujours en même endroit. Les modifications du rendement sont presque toujours dans le sens d'une augmentation importante. Ainsi la vitamine PP double le rendement de *W. perfringens* et de *E. nitritogenes*, sans changer leur type fermentaire, mais quintuple celui de *Cl. pseudo-fallax* en le transformant en ferment acéto-butyrique, quadruple celui de *Cl. histolyticum* sans le transformer, ainsi que celui de *F. girans* en faisant apparaître un troisième acide.

La vitamine B<sub>1</sub> a une action beaucoup moins stimulante; par ailleurs elle est moins bien supportée et 5 de nos souches n'ont pas pu être repiquées sur milieu aneuriné. La vitamine H', très bien supportée, triple le rendement de *C. fallax* en le transformant en acéto-butyrique, quintuple celui de *Cl. pseudo-fallax* en lui faisant subir le même sort, sextuple celui de *Cl. histolyticum*, quintuple celui de *F. girans*. La vitamine C double le rendement de *W. perfringens*, triple celui de *E. nitritogenes*, quadruple celui de *Cl. fallax*, multiplie par 7 celui de *Cl. pseudo-fallax*, triple celui de *Cl. histolyticum*.

Ici encore c'est le type acéto-butyrique qui est le plus stable et en général les variations constatées au cinquième passage sont plus intenses que celles constatées en dixième passage. Il y a un paradoxe apparent dans ces constatations, puisque les milieux contiennent naturellement les vitamines H' et PP. Mais la pharmacodynamie est remplie d'exemples du même ordre, montrant que les substances très actives sur les êtres vivants agissent différemment suivant les doses administrées (iode, arsenic, digitale, etc.).

III. Métaux. — Nous avons étudié l'action de quelques métaux sur les fermentations anaérobies; l'un a été choisi à cause de sa réputation de métal hautement bactéricide: l'argent, employé sous forme de nitrate à la dose subléthale; les autres à cause de leur action oligodynamique soit stimulante, soit empêchante: le nickel, sous forme de chlorure, le cérium sous forme de nitrate, l'uranium sous forme de nitrate, le zinc sous forme de sulfate et le cobalt sous forme de nitrate. Pour étudier l'action sur la souche la dose a été de 0,5 c. c. d'une solution à 1 p. 100 par tube de Hall. Pour étudier l'action directe sur la fermentation la dose a été de 3 c. c. de la solution à 1 p. 100 en fioles d'Erlenmayer de capacité utile 750 c. c.

Comme les colorants et les vitamines, les métaux provoquent des modifications du type fermentaire des anaérobies, ainsi que des stimulations ou des inhibitions de l'intensité de la fermentation. Chaque microbe réagit à chaque métal de façon propre; en général l'uranium et l'argent abrègent le temps de fermentation, le zinc et le cobalt l'allongent, le cérium et le nickel n'ayant pas d'action sur lui. Cette action sur la durée de fermentation n'est pas parallèle à l'action sur son intensité: l'argent stimule surtout le rendement de *W. perfringens* qui est triplé, celui de *Cl. fallax* qui est quadruplé, celui de *Cl.*

*pseudo-fallax* qui est décuplé, celui de *Cl. histolyticum* qui est quintuplé. Le nickel multiplie par 7 celui de *Cl. fallax*, quadruple celui de *Cl. histolyticum* et celui de *F. girans*; le zinc quadruple le rendement de *Cl. pseudo-fallax* et de *Cl. histolyticum*. Le cobalt multiplie celui de *Cl. histolyticum* par 5,5. Le cérium triple celui de *E. nitritogenes* et de *Cl. histolyticum*. L'uranium est en général inhibiteur, sauf vis-à-vis de *Cl. fallax* et de *Cl. histolyticum* dont il triple le rendement, alors qu'il décuple celui de *F. girans*. Ce dernier est d'ailleurs tué après 20 passages au contact de nitrate d'urane, aussitôt après avoir présenté cette remarquable augmentation de rendement.

En résumé, on peut agir de façon intense sur la fermentation des anaérobies par l'addition de colorants, de vitamines et de métaux, et ces faits seraient susceptibles d'applications pratiques telles que l'amélioration des rendements industriels ou tests pour l'étude du métabolisme des anaérobies.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

## RÉACTION DE LA DÉVIATION DU COMPLÉMENT AVEC DES SÉRUMS DE TUBERCULEUX PAR UN ANTIGÈNE ENTIÈREMENT SYNTHÉTIQUE : ACIDE GRAS $\alpha\alpha$ -DISUBSTITUÉ

par JEAN PARAF, JEAN DESBORDES et GENEVIÈVE LOUBRY.

On sait que la recherche d'un antigène déviant le complément dans le sérum de malades tuberculeux est un problème biologique d'un grand intérêt : jusqu'à ce jour les travaux relatifs à ce point étaient, à notre connaissance, uniquement consacrés aux antigènes biologiques extraits du bacille lui-même. Les travaux que nous présentons aujourd'hui utilisent des produits synthétiques que nous étudions depuis longtemps à d'autres fins que la sérologie avec MM. Buu-Hoï et Cagniant, mais dont le pouvoir antigénique que nous mettons ainsi en évidence confirme la valeur spécifique.

La partie active des antigènes biologiques n'est pas encore connue. On a tour à tour incriminé les polysaccharides, les protéines et les lipides du bacille. En fait le problème se présente sous un jour particulièrement complexe. Si tous les auteurs sont d'accord pour convenir que les polysaccharides sont surtout des substances spécifiques de précipitine, par contre la controverse reste vive entre ceux qui voient dans les protéines la substance antigénique active et ceux qui s'en tiennent aux lipides comme agent de fixation de complément.

En réalité, il est fort difficile à l'heure actuelle de séparer ces deux principes (protéides, lipides) lors des extractions faites à partir du corps bacillaire et bon nombre de travaux sont de ce fait entachés d'erreurs.

Les travaux de différents auteurs, en particulier ceux de Machebœuf et M<sup>lle</sup> Faure, nous ont appris que les substances actives au point de vue



sérologique ne sont pas azotées, mais que toutes les fonctions actives contiennent du phosphore. Ce sont des lipides phosphorés. Comme on n'a pas pu arriver à séparer complètement les uns des autres ces corps, on ne peut savoir, en utilisant les techniques d'extraction chimique, sur lequel se trouve fixée l'activité sérologique.

Suivant l'expression même de Machebœuf, « tout ce qu'on peut dire c'est que l'activité haptène de fixation de l'alexine ou déviation du complément appartient à un acide phosphatidique ou à plusieurs acides phosphatidiques voisins ».

Il reste donc à trancher la question des acides gras.

Dès que l'on aborde le problème par l'analyse, c'est-à-dire par le clivage de la molécule phosphatidique, on se heurte à des difficultés de solubilité. C'est ainsi que l'affinité pour l'eau des sels de ces acides gras (sels d'acides phosphatidiques) est telle que si l'on agite la solution étherée de sels d'acides gras avec de l'eau, ces derniers passent de l'éther dans l'eau.

Ces corps s'hydrolysent facilement même à froid, dans  $\text{SO}_4\text{H}_2$  dilué en libérant progressivement leurs acides gras au fur et à mesure qu'ils perdent leur activité haptène.

Un fait extrêmement intéressant est mis en lumière par les travaux de Machebœuf qui a réussi à extraire du bacille de Loeffler (très riche en lipides, comme on le sait) une fraction de lipides phosphorés qui réagit intensément avec les sensibilisatrices tuberculeuses. Une telle diffusion parmi les bactéries d'haptènes lipidiques à spécificité peu stricte explique peut-être le peu de spécificité bien connu des réactions de fixation de l'alexine qui ne peuvent pas servir à différencier qualitativement les diverses espèces ou souches acido-résistantes.

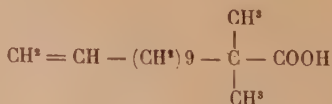
\*  
\* \*

Mais si nous abordons le problème par la voie synthétique il nous semble que l'on peut tirer des conclusions plus fermes.

Les résultats déjà obtenus par Buu-Hoï, Ratsimamanga et Cagniant et ceux que nous avons mis en évidence avec ces mêmes auteurs permettent d'attribuer aux acides gras  $\alpha\alpha$ -disubstitués un rôle prépondérant.

Ces premiers travaux montrant une action de tels corps synthétiques dans le déclenchement et la production du phénomène de Koch sur le cobaye et une action dans le déclenchement des réactions d'allergie sur le malade tuberculeux, nous nous sommes demandé si nous pourrions compléter ce syndrome d'activité par une déviation du complément des sujets atteints de tuberculose en utilisant ces mêmes acides gras comme antigènes.

Pour ce faire nous avons fait trois séries d'épreuves en utilisant comme antigène une émulsion aqueuse de l'acide gras  $\alpha\alpha$ -disubstitué suivant préparé par Buu-Hoï et P. Cagniant :



Pour servir de témoin nous avons pris comme acide gras linéaire, l'acide oléique.

Comme sérum nous avons choisi :

Le sérum de 20 sujets tuberculeux cliniquement en état d'évolution ;

Le sérum de 5 sujets sains indemnes de toute atteinte tuberculeuse ;

Du sérum de cheval inoculé avec du BCG ;

Enfin un certain nombre de nos réactions sérologiques étaient faites en double en prenant comme second antigène, l'antigène méthylrique de Nègre et Boquet.

\*  
\* \*

Des expériences préliminaires nous ont montré que nos acides gras n'étaient ni hémolytiques, ni anti-hémolytiques aux doses que nous utilisons.

Nous avons pratiqué la réaction de fixation classique avec des doses croissantes d'alexine et les tubes témoins habituels en utilisant les deux antigènes précités.

1° Avec le sérum de cheval immunisé par le BCG, les résultats sont totalement négatifs avec les 2 antigènes (acide  $\alpha\alpha$ -disubstitué et acide à chaîne linéaire) ;

2° De même avec les 5 sérums de sujets sains indemnes de toute lésion tuberculeuse les résultats furent constamment négatifs.

3° Avec les sérums de 20 tuberculeux cliniquement en état d'évolution, nous avons obtenu avec l'antigène  $\alpha\alpha$ -disubstitué : 13 résultats positifs, 7 résultats négatifs.

Par contre en utilisant l'antigène linéaire les résultats furent toujours négatifs.

Ajoutons que ceux de ces mêmes sérums qui furent éprouvés à l'aide de l'antigène Boquet-Nègre ont fourni : 6 résultats positifs, 4 résultats négatifs, ce qui donne à peu près le même pourcentage.

Mais les mêmes sérums ne donnent pas avec les mêmes antigènes un même résultat positif. C'est ainsi que 4 sérums étaient positifs par les 2 antigènes (acide  $\alpha\alpha$ -disubstitué et Boquet-Nègre) et que 3 étaient négatifs avec les deux séries d'antigènes. Le reste de ceux de nos résultats qui furent faits en double était « panaché » sans que l'on puisse en tirer de conclusion pour l'instant. Les résultats négatifs avec les sujets tuberculeux et en particulier ceux obtenus avec le sérum de cheval traité par le BCG nous semblent des plus intéressants et faciles à interpréter.

En effet, nous avons utilisé un seul acide  $\alpha\alpha$ -disubstitué et ces résultats ne sont pas pour nous surprendre : toutes les méthodes analytiques ont montré que le bacille de Koch est vecteur non pas d'un seul acide gras du type considéré mais de toute une série d'acides  $\alpha\alpha$ -disubstitués. Peut-être ces acides sont-ils libérés dans l'organisme parasité d'une façon différente selon les cas, les races de bacilles, etc., si bien que suivant le malade c'est un groupe d'acides de tel ou tel type qui a une fonction antigène prépondérante. D'où réaction positive dans les sérums ou d'allergie sur la peau du malade avec un acide et non avec un autre. Si l'on n'utilise pas exactement l'acide synthétique correspondant on obtient une réaction négative.

C'est pourquoi il est vraisemblable que dans les cas examinés dans

cette note, seulement certains malades réagissent à l'acide étudié et c'est pourquoi d'autres ne réagissent pas, en particulier le sérum de cheval traité par le BCG.

\*  
\* \*

On peut donc penser qu'un antigène polyvalent devra être composé d'un mélange d'acides gras qui réagiront forcément sur un plus grand nombre de malades qu'un seul acide.

Le rôle des protéines est également à considérer, non pas sans doute comme élément prédominant mais comme « orienteur » suivant les récentes conceptions bio-chimiques. Le véritable antigène complet étant peut-être constitué de l'ensemble : protéine + acide gras  $\alpha\alpha$ -disubstitué, selon les conceptions établies par Landsteiner et ses élèves. Il est du reste bien connu que si l'antigène de Debains, qui contient les lipides de 4 souches humaines et une bovine est le plus sensible vis-à-vis des anticorps lipoïdiques, il y a longtemps (Besredka, Sandor) que l'on a montré que dans le sang des animaux injectés et dans le sang des malades il y avait 2 sortes d'anticorps : anticorps lipoïdiques et anticorps protidiques. Du reste chez certains malades (formes graves et cachectiques) les anticorps protidiques peuvent être dominants. Dans ce cas l'antigène de Besredka préparé par lyse du corps entier du bacille de Koch est par suite plus sensible.

Bien entendu, c'est un premier résultat que nous obtenons ici. La sérologie de la tuberculose en prenant comme nouvelle base d'étude des antigènes synthétiques, devra être approfondie et en particulier il faudra vérifier l'influence possible d'incidences diverses, telle l'action de sérum de sujet ayant un Bordet-Wassermann positif, etc.

Mais notre but poursuivi est surtout d'étudier l'influence des acides gras  $\alpha\alpha$ -disubstitués plus que les détails de la sérologie de la tuberculose.

Les qualités d'un bon antigène sont : spécificité et sensibilité ; l'antigène que nous avons préparé doit être étudié dans ces deux sens et c'est ce que nous faisons au laboratoire avec MM. Buu-Hoi et P. Cagniant.

(Laboratoire de Recherches du Service de Phtisiologie de l'Hôpital Bichat et Laboratoire de Recherches des Etablissements Roussel.)

## AU SUJET DU CYCLE ÉVOLUTIF D'ENDOCOCCUS

### MORIFORMIS *nv. sp.* PINOY 1941.

par JEAN GUSTAVE MARCHAL et ÉLIANE DESOSOUX.

Dans des mémoires antérieurs l'un de nous, en collaboration avec P. Pinoy (1) a décrit les différentes formes qu'est susceptible de

(1) P.-E. PINOY et J.-G. MARCHAL, *C. R. Soc. Biol.*, 1941, 125, 1489 ; *Bull. Soc. Hist. natur. Afrique du Nord*, 34, 122, avec planches microphotographiques.

prendre, au cours de son évolution, un organisme isolé à Alger en 1940, et décrit sous le nom d'*Endococcus moriformis*. Ce germe, qui est doué d'une certaine virulence vis-à-vis des jeunes lapins, a été classé comme étant voisin des *Synechocystis* Sauvageau : c'est une chroococcacée comportant une phase bacillaire.

De nombreuses cultures, effectuées en chambre à huile à partir d'unités isolées à l'aide du micromanipulateur de Fonbrune, nous ont montré que si *Endococcus moriformis* pouvait se présenter sous une forme coccique et sous une forme bacillaire il n'était pas possible de sélectionner ces deux formes. Nous sommes conduits aujourd'hui à préciser davantage les relations existant entre les phases cocciques et les phases bacillaires présentées par ce micro-organisme.

Les formes cocciques sont incontestablement de beaucoup les plus résistantes. Isolées par unités en chambre à huile et en milieu liquide elles se meuvent pendant un certain temps à l'aide d'un cil. Tout en restant rondes elles grossissent pour atteindre dans les milieux pauvres 15 à 20  $m\mu$  de diamètre. A ce stade elles s'immobilisent, tout en devenant granuleuses. Ceci est le prélude à la fragmentation en une multitude de diplocoques mobiles. Les éléments constituant ces diplocoques peuvent rester accolés ou se séparer.

Dans des milieux liquides plus riches, ces formes rondes se fragmentent dans une série de plans perpendiculaires pour donner une morula typique, que l'on peut par microdissection cliver pour aboutir à une tétrade.

Les formes rondes ainsi agrégées peuvent subsister durant de longs mois. Elles deviennent visibles à l'œil nu et sont colorées en rose saumon.

Dès que les conditions sont devenues favorables, elles ne tardent pas, par lyse de leur membrane, à laisser échapper une multitude de diplocoques mobiles, qui se répandent dans tout le milieu nutritif, et vont, si celui-ci n'est pas épuisé, redécrire le même cycle.

Ces formes rondes diplococciques peuvent cependant évoluer différemment lorsqu'elles sont placées sur des milieux à base de gélose. Dans ces conditions en effet elles s'allongent pour prendre l'aspect bacillaire ou diplobacillaire. Ces formes sont elles-mêmes mobiles.

Les éléments bacillaires sont des éléments fragiles. Isolés par unité ils ne donnent naissance à une culture que dans des conditions toutes particulières.

Le degré d'humidité de la gélose, sa concentration en ions hydrogène, la présence de substances favorisant le développement [apportées soit par des hématies de divers animaux, soit par une primoculture de formes rondes] (2) sont des facteurs essentiels permettant le développement de la forme bacillaire.

Cette phase bacillaire peut évoluer de deux façons différentes. Par division transversale, suivant le procédé habituel propre à tous les bacilles, elle constitue, dans certains cas, une véritable forme d'envahissement. C'est ainsi que si l'on dépose sur une goutte de gélose peptone, placée en chambre à huile, quelques bacilles, ceux-ci, par ce processus, ne tardent pas à envahir toute la surface de la goutte.

(2) P.-E. PINOY et J.-G. MARCHAL. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **426**, 738.



Dans d'autres conditions la forme bacillaire présente un mode de reproduction un peu différent. C'est ainsi que placés dans des gouttes de bouillon peptoné ou de liquide synérétique, exsudées d'une gélose peptonée les bacilles perdent rapidement leur motilité. Ils grossissent, présentant bientôt trois cloisons transversales parallèles, puis une cloison longitudinale perpendiculaire aux premières ne tarde pas à se former.

La forme allongée initiale se trouve ainsi partagée en 8 éléments, que 4 nouvelles cloisons transversales secondaires fragmentent de nouveau en 16 éléments, que des cloisons longitudinales secondaires parallèles à la cloison longitudinale initiale divisent le nouveau et ainsi de suite.

La grosseur de ces formations est fonction de la richesse en matières nutritives du milieu mis à leur disposition.

Par lyse de leur membrane, sous l'influence de diastases particulières et dans des conditions favorables les morulas allongées obtenues libèrent à leur tour des diplocoques mobiles. Ceux-ci vont recommencer le cycle décrit, une fois transportés dans un milieu neuf, ou au contraire s'entassent dans la goutte liquide où ils ont pris naissance, et vont s'autolyser lentement.

De toutes ces observations il résulte qu'*Endococcus moriformis* selon les conditions de culture se présente sous une forme coccique ou sous une forme bacillaire. Que cette dernière peut se multiplier comme tous les bacilles par division transversale ou bien se fragmenter suivant un mode particulier de cloisonnement primaire dans des plans perpendiculaires. On obtient ainsi des morulas allongées, qui, comme les morulas auxquelles aboutit l'évolution des formes cocciques se résolvent en de nombreux diplocoques mobiles.

Le cycle évolutif d'*Endococcus moriformis* est susceptible de jeter un jour nouveau sur le cycle évolutif des *Rickettsia*, agent des fièvres exanthématiques.

(Laboratoire de Sciences Naturelles  
de la Faculté de Pharmacie de Nancy.)

## COMPLÉMENT ET TACTISME LEUCOCYTAIRE

par A. DELAUNAY et J. PAGES.

L'un de nous a montré précédemment (1) qu'on ne peut observer de tactisme leucocytaire *in vitro* que si les globules blancs sont maintenus dans des milieux riches en ion calcium. Facteur nécessaire, l'ion calcium n'est cependant pas suffisant pour permettre à lui seul le déplacement des cellules. D'autres facteurs sont requis. Nous allons montrer au cours de cette communication que la présence dans le milieu d'une certaine quantité de sérum sanguin frais est également nécessaire.

(1) Ces *Annales*, 1944, 70, 372.

Pour ces nouvelles recherches sur le tactisme, nous avons eu recours, une fois encore, à la technique mise au point par M. Comandon et qui a le gros avantage de la simplicité. Des grains d'amidon, isolés extemporanément de la pomme de terre, sont étalés sur lames et fixés par dessiccation. Ces grains constituent, dans les conditions normales, des agents chimiotactiques fort puissants. Il suffit, pour s'en assurer, de déposer sur les lames quelques gouttes d'un exsudat péritonéal de cobaye riche en polynucléaires, de recouvrir les gouttes d'une lamelle, de luter celle-ci et de mettre la préparation dans une étuve à 37°. Presque aussitôt se produit une migration très nette des cellules vers les grains d'amidon.

De toute évidence, la réaction est rapide et intense parce que les leucocytes trouvent dans le liquide péritonéal un milieu physiologique parfait. Nous nous sommes demandé comment elle évoluait lorsque les cellules sont placées dans des milieux artificiels. A cet effet, nous avons lavé par trois centrifugations et dans du liquide de Ringer, des polynucléaires d'exsudat prélevés chez le cobaye, afin de les débarrasser de toute trace de plasma. Le dernier culot fut repris par du Ringer et quelques gouttes de cette suspension leucocytaire furent déposées, comme il a été dit plus haut, sur des lames porteuses de grains d'amidon. Dans ces conditions, les cellules — morphologiquement intactes — demeurèrent immobiles. Le tactisme fit également défaut lorsque les cellules lavées furent remises en suspension dans du Ringer glucosé et même dans du Ringer glucosé tamponné par du bicarbonate (Tyrode).

Nous avons alors pensé à compléter nos liquides de suspension par adjonction d'albumines banales : albumine d'œuf, nucléoprotéines extraites du foie ou des leucocytes eux-mêmes. Mais ce fut en vain : dans ces nouvelles solutions, l'immobilité des globules blancs reste complète. Les milieux artificiels, malgré leur teneur en calcium, ne permettent donc pas aux leucocytes de se déplacer. Le milieu sérique paraît, ici, indispensable.

Les polynucléaires lavés de cobaye repris par du sérum frais de cobaye et déposés sur des lames préparées se dirigent aussitôt vers les grains d'amidon. La réaction est aussi nette, dans la majorité des cas, lorsqu'on remplace le sérum homologue par des sérums frais de lapin, de mouton, de cheval ou du sérum humain. Mais elle diminue rapidement d'intensité lorsqu'on utilise un sérum de plus en plus dilué par du Ringer. Par exemple, une dilution au 1/10 de sérum de cobaye permet encore aux phénomènes de tactisme de se manifester normalement. En revanche, lorsque les globules blancs sont déposés dans un sérum dilué cinquante fois, ces mêmes phénomènes cessent de se produire.

*Pour qu'il y ait tactisme leucocytaire, il est absolument nécessaire de recourir à des sérums frais.* Des sérums gardés à la glacière pendant quelques semaines perdent progressivement leur pouvoir de favoriser le tactisme. Par exemple, dix jours après la saignée, ce pouvoir se retrouve encore très net dans les sérums de cobaye, mais dix jours plus tard, il a disparu à peu près complètement. Mis en suspension dans ces vieux sérums, les leucocytes se comportent comme dans les solutions artificielles : ils restent absolument immobiles.

La mise en évidence de cette action défavorable exercée par le vieillissement sur les sérums nous a conduits à rechercher l'action du chauffage. Aussi avons-nous chauffé des sérums frais de cobaye, pendant une demi-heure ou une heure, au bain-marie à 37°, à 45°, à 50° et à 56°. L'action du chauffage fut nulle à 37° et à 45°. En présence de sérum chauffé à 50°, le tactisme leucocytaire s'effectua aussi bien que normalement. Il fit totalement défaut dans les sérums chauffés à 56°. Nous avons pu voir que le chauffage ne fait pas apparaître un principe inhibiteur, mais qu'il agit en détruisant une substance indispensable : en effet, les cellules se déplacent fort bien vers les grains d'amidon lorsqu'elles sont placées dans un milieu renfermant 9 parties de sérum chauffé et 1 partie de sérum frais.

Altération progressive par vieillissement, destruction rapide par chauffage à 56°, ce sont là propriétés classiques du complément. Nos recherches ultérieures ont donc été faites dans le dessein de voir s'il y avait une corrélation entre la teneur d'un sérum en complément et son action plus ou moins favorisante sur le tactisme leucocytaire. Elles ont toutes confirmé l'existence de cette corrélation.

a) Le tactisme dépend directement, dans son intensité, de la teneur des sérums frais en complément, telle qu'on peut déterminer celle-ci par la méthode hémolytique. Il est toujours très accusé dans les sérums de cobaye dont nous avons vérifié la richesse en complément. Il est souvent moins net dans les autres sérums : sérums de lapin, de cheval, etc., normalement plus pauvres en alexine.

b) Un sérum ne permet les déplacements leucocytaires que s'il renferme une quantité déjà importante de complément. De vieux sérums ou des sérums modérément chauffés qui n'ont pas complètement perdu leur alexine sont souvent devenus incapables de favoriser le tactisme. Cette remarque cadre bien avec nos constatations initiales. Pour obtenir un tactisme, il faut absolument opérer avec un sérum dilué moins de cinquante fois.

c) Si l'on supprime dans un sérum le complément en fixant celui-ci, de façon spécifique, sur des microbes sensibilisés par un anticorps approprié, ce sérum décomplémenté ne peut plus servir pour les expériences de tactisme : dans un pareil milieu, les leucocytes restent immobiles.

d) Mais voici des expériences encore plus démonstratives. Dans l'état actuel de nos connaissances, le complément apparaît formé par quatre constituants dont deux sont thermolabiles. Les deux autres sont thermostables, mais on connaît des moyens de les détruire séparément. C'est ainsi qu'un sérum frais traité par du venin de cobra ou de la levure fraîche perd le constituant n° 3 ; l'ammoniaque supprime rapidement d'un sérum le constituant n° 4. Ayant traité différents sérums frais de cobaye par du venin de cobra, de la levure ou l'ammoniaque, nous avons vu que ces sérums privés d'un des constituants thermostables du complément ne permettaient plus le tactisme. Nous avons, par la suite, mélangé deux sérums, l'un privé du constituant n° 3, l'autre du constituant n° 4, de façon à refaire un milieu renfermant tous les constituants de l'alexine. Dans ce milieu, les polynucléaires se dirigèrent parfaitement vers les grains d'amidon.

e) Nous pouvons apporter enfin une nouvelle preuve en faveur du

rôle que joue le complément dans les phénomènes de tactisme leucocytaire. Bordet et d'autres auteurs ont démontré que le citrate de soude entrave la production des phénomènes lytiques en empêchant la fixation de l'alexine. Ils ont montré de plus que cette action inhibitrice peut être neutralisée par l'addition de sels solubles de calcium. Nous sommes désormais tentés de croire que, dans nos expériences antérieures, le calcium que nous ajoutions à nos plasmas citratés (2) agissait à la fois en augmentant de façon directe l'activité des leucocytes et en donnant au complément sa liberté d'action.

En résumé, les expériences que nous venons de rapporter indiquent que le complément — ou du moins un complexe qui lui serait étrangement apparenté — joue un grand rôle dans les phénomènes de tactisme leucocytaire. A vrai dire, le complément ne se borne pas à permettre le tactisme des globules blancs. Dans des recherches qui seront exposées ailleurs, nous avons pu voir que l'alexine se montre encore capable de « stimuler » *directement* les polynucléaires au cours de la phagocytose et qu'elle augmente nettement, qu'elle double par exemple, le métabolisme respiratoire des polynucléaires étudié dans l'appareil de Warburg.

Tous ces résultats, croyons-nous, présentent quelque intérêt. Jusqu'alors, en effet, on ne reconnaissait au complément qu'une action sur les microbes : bactériolyse ou opsonisation. Les faits que nous avons exposés indiquent que le complément intervient aussi dans l'activité physiologique des globules blancs. Intervient-il encore dans la physiologie des autres cellules de l'organisme ? La question mérite d'être posée ; nous nous efforcerons de lui apporter une réponse.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

## **SUR LES PROPRIÉTÉS ANTITUBERCULEUSES DE COMBINAISONS D'ACIDES GRAS DU BACILLE DE KOCH AVEC UNE PROTÉINE**

par BUU-HOI et J.-P. JOUIN.

Il avait déjà été montré par Anderson et ses collaborateurs (1) que certaines fractions lipoidiques du bacille de Koch se montrent toxiques pour l'animal d'expérience. Ces fractions lipoidiques doivent donc, dans une certaine mesure, constituer ce qu'on a appelé un *partigène*. Il était alors logique, dans ces conditions, de penser que, combiné à une matière protéique connue, ce *partigène* pût devenir un *antigène*

(2) Dans ces plasmas citratés, le calcium du plasma et le citrate se combinaient en formant un complexe, si bien qu'il n'y avait plus d'ion calcium libre dans la solution.

(1) ANDERSON, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, 1939, 145.



tuberculeux. Cependant il a aussi été montré par l'un de nous (2) que la présence de doubles liaisons augmente la toxicité des acides gras ramifiés. Il est probable qu'il en est de même pour les lipoides non saturés du bacille de Koch.

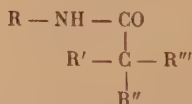
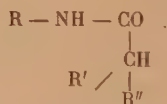
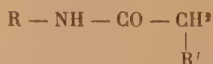
Dans ces conditions, nous avons fabriqué un antigène ainsi constitué. Dans un premier temps on extrait de bacilles préparés à partir de plusieurs souches virulentes humaines, les acides gras de poids moléculaire moyen, tels qu'ils ont été définis par Anderson, c'est-à-dire les acides gras distillables de poids moléculaire compris entre  $C^{18}$  et  $C^{30}$  environ, à l'exception par conséquent des cires et des acides-alcools rencontrés dans les bacilles.

Ces acides gras totaux renferment des doubles liaisons que démontre l'existence d'un indice d'iode notable, doubles liaisons qui sont supprimées par réduction catalytique à l'aide de l'hydrogène en présence du platine.

De toute façon les acides ainsi obtenus ne pouvaient être tout au plus que des haptènes. A partir de ces corps on pouvait espérer, par combinaison avec une protéine, obtenir un antigène. C'est ce que nous avons réalisé dans un second temps.

Les acides totaux hydrogénés ont été transformés en chlorures d'acide et combinés avec l'ovalbumine d'après une technique inspirée de celle de Landsteiner et Lampl (3), employée par ces auteurs dans des cas analogues de synthèse d'antigènes à fonction amide.

La liaison entre l'haptène et l'ovalbumine se fait par amidification des groupements aminés libres de cette protéine par les radicaux acides ramifiés d'origine bacillaire. On obtient ainsi une substance insoluble dans l'eau qui doit être constituée par un mélange de corps de formules :



(R, radical protéique; R', R'' et R'''; radicaux alcoyles plus ou moins ramifiés).

Cependant, par broyage lent et patient, on parvient à une solution colloïdale qui en permet l'injection.

L'expérimentation fut effectuée sur trois lots de cobayes.

1<sup>o</sup> Un premier lot fut préparé et les bêtes reçurent en trente-cinq jours 6 injections intramusculaires de 0,25 g. de cette préparation en suspension dans 1 c. c. d'eau.

(2) BUU-HOÏ et RATSIMAMANGA, *C. R. Soc. Biol.*, 1943, 437, 369.

(3) LANDSTEINER, *Die Spezifität serologischer Reaktionen* (Springer, 1933).

Au bout de ce temps, les animaux furent éprouvés à la tuberculine, épreuve qui se révéla négative.

Puis ils furent inoculés avec 1 c. c. d'une suspension au 1/1.000 d'une culture de bacille de Koch H 239 âgée de onze jours sur pomme de terre.

Un échec complet est à enregistrer. Tous les animaux présentèrent des lésions semblables à celles des témoins avec ganglions inguinal et sous-lombaire, atteinte de la rate, du foie et des poumons.

2° Un second lot fut inoculé en même temps que traité à raison d'une injection par semaine pendant six semaines. On eut l'impression que la tuberculose de ces animaux était moins développée que celle des témoins, mais aucune conclusion ne put être tirée, comme dans toute expérience en matière de tuberculose où, suivant les lots d'animaux, des résultats discordants s'observent.

3° Un troisième lot fut traité dix jours après l'inoculation et le nombre des injections fut de 4.

Là l'échec fut aussi complet.

En conclusion :

Par liaison amidique des acides gras saturés du bacille de Koch avec des protéines étrangères, on ne peut donc obtenir une substance immunisante contre la tuberculose.

Des expériences sont en cours qui permettront de dire si d'autres genres de liaisons chimiques contractées entre les différentes fractions du bacille de Koch peuvent se montrer antigéniques et immunisantes.

(Institut Pasteur.)

## RÉCEPTIVITÉ DU SINGE CALLITRICHE (*ÆTHIOPS SABAEUS*) A LA SOUCHE " LANSING " DE VIRUS POLIOMYELITIQUE ENTRETENUE SUR LA SOURIS

par G. J. STEFANOPOULO et J. VIEUCHANGE.

Au cours de ses expériences sur le virus poliomyélitique (souche Lansing) qu'il a adapté au rat du coton (*Sigmodon hispidus hispidus*), puis à la souris blanche, Ch. Armstrong (1) a étudié la virulence de cette souche pour le singe (espèce non précisée). Avec le virus-souris du quatrième passage, cet auteur a enregistré des résultats négatifs. Par contre, celui du sixième passage a déterminé chez le singe, par inoculation intracrânienne, l'apparition de signes pathologiques quoique relativement discrets (fièvre, tremblement, faiblesse des membres supérieurs) ; la présence de virus dans la moelle a été mise en évidence par l'inoculation à un animal de la même espèce.

Stefanopoulo, Duvalon et Etévé (2), au cours d'un premier essai,

(1) Ch. ARMSTRONG, *Publ. Health Rep.*, 1939, **54**, 2302.

(2) G. J. STEFANOPOULO, S. DUVALON et J. ETÉVÉ. *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 343.

ont inoculé par voie sous-cutanée un *rhesus* avec du virus-souris (quarante-quatrième passage sur souris) sans qu'aucune paralysie se soit développée ; toutefois ce singe a présenté de légers symptômes morbides de courte durée et les auteurs ont constaté une augmentation passagère du nombre des éléments cellulaires dans le liquide céphalo-rachidien (24 au quatrième jour, 218 au septième jour et 11 au dix-huitième jour). La recherche du virus dans le sang, le liquide céphalo-rachidien ou les selles, par inoculation à la souris, est restée négative.

Ces résultats nous ont incités à reprendre l'étude de la virulence de la souche Lansing pour le singe callitriche, *Cercopithecus æthiops sabæus* (L.).

*Virus.* — Nous avons utilisé la souche « Lansing » adaptée à la souris blanche par Armstrong. Cette souche, envoyée en 1940 à M. C. Levaditi, a été entretenue sur la souris, dans le laboratoire de ce dernier, puis, de novembre 1943 jusqu'au moment de l'inoculation du singe (avril 1944) [12 passages] à l'Institut Pasteur par l'un de nous (3).

Le matériel inoculé était constitué par le mélange de fragments des névraxes (moelle et cerveau) glycélinés de deux souris sacrifiées paralysées le onzième jour après l'inoculation. La suspension a été préparée au taux de 1 p. 20 dans l'eau physiologique.

*Expérience.* — L'inoculation a été faite par voie intracérébrale le 14 avril 1944 au callitriche n° 786 femelle, adulte, à la dose de 0,50 c. c.

Deux lots de 8 souris témoins ont été inoculés par voie intracérébrale, avec la même suspension virulente. Pour le premier lot, la mortalité a été de 4 sur 8 avec lésions histologiques positives du névraxe. Pour le second lot, le nombre d'animaux positifs a été de 7 sur 8 : 2 paralysies et 5 morts (avec contrôle histologique positif).

*Résultats.* — L'examen du liquide céphalo-rachidien prélevé avant l'inoculation montrait 8,3 leucocytes par millimètre cube et 0,40 g. d'albumine p. 1.000.

Le septième jour après l'inoculation, on compte 57 lymphocytes et 1,5 polynucléaires. Le taux d'albumine est de 0,60 g.

On note, le huitième jour après l'inoculation, une excitabilité particulière du singe.

Le treizième jour, l'animal, secoué de frissons, reste prostré, replié sur lui-même, les membres fléchis.

Le quinzième jour, il ne peut plus se tenir en équilibre sur les barreaux de la cage. Assis sur le train postérieur et se soutenant difficilement avec ses membres antérieurs, il oscille lentement dans un mouvement de va-et-vient latéral. Sa main droite présente une paralysie flasque. Mis hors de sa cage, il ne réussit qu'à se projeter en avant, sans soulever son train postérieur et retombe aussitôt. Par quelques excitations et mouvements passifs, on déclenche l'apparition de crises convulsives, avec une phase tonique suivie d'une seconde phase clonique.

Les jours suivants, l'animal reste à peu près inerte. Il tente de mordre. On ne réussit plus à déclencher de crises convulsives. La paralysie flasque s'étend maintenant à tout le membre supérieur droit avec abolition des réflexes tendineux. Les trois autres membres sont contracturés, malhabiles et de force très diminuée, avec exagération des réflexes tendineux.

Vers le vingtième jour, il devient nécessaire, pour l'alimenter, de placer la nourriture directement dans la bouche de l'animal. Celui-ci manifeste une soif très vive et a conservé les mouvements de mastication et de déglutition.

(3) J. VIEUCHANGE. Ces *Annales*, 1946, 72, 446.

La température, qui était de 37° au moment de l'inoculation, a présenté une légère élévation du quatrième au sixième jour (38°, 38°3) et le treizième jour (39°3), pour se maintenir autour de 37° jusqu'à la fin de l'évolution de la maladie.

L'analyse des urines, au vingt-deuxième jour, permet de déceler la présence de sucre (31 g. p. 1.000).

Durant les derniers jours, l'animal a beaucoup maigri. Le vingt-sixième jour, il est complètement inerte. On le sacrifie par saignée, sous anesthésie à l'éther (10 mai 1944). On n'observe rien de notable à l'autopsie.

*Recherche du virus.* — On a recherché la présence de virus dans le

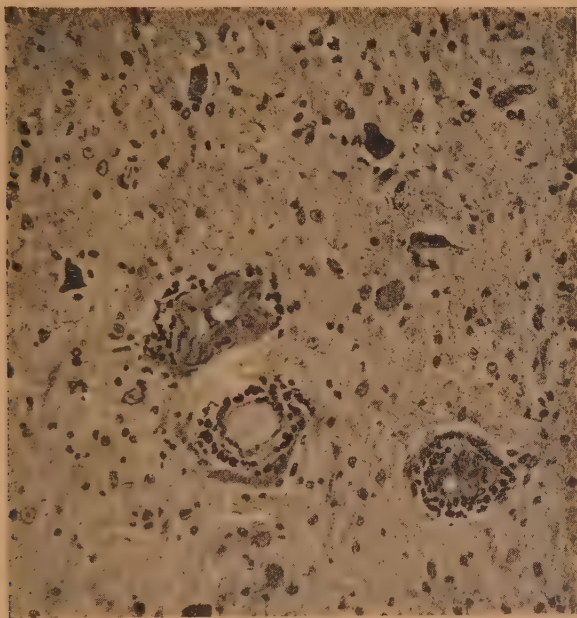


Fig. 1. — Poliomyélite. — Souche Lansing. — Maladie expérimentale du singe (*Ethiops Sabaeus*) Cerveau : manchons périvasculaires et lésions des neurones. Gross.  $\times 300$ . (Photo P. Jeantet.).

liquide céphalo-rachidien prélevé à deux reprises (le septième et le douzième jour de la maladie) dans le sérum et différents organes (cerveau, moelle cervicale, ganglions mésentériques, surrénale) prélevés après la mort de l'animal. Ces divers échantillons, inoculés par voie intracérébrale à des souris, n'ont déterminé chez aucun de ces animaux l'apparition de signes poliomyélitiques, ni provoqué le développement d'un état réfractaire quelconque à l'égard de l'inoculation d'épreuve.

#### EXAMEN HISTOLOGIQUE DU SYSTÈME NERVEUX.

*Cerveau.* — Les coupes pratiquées à différents niveaux montrent une congestion des vaisseaux et des manchons périvasculaires à prédominance monocyttaire (fig. 1). Certaines plages du parenchyme sont infiltrées par



des cellules lympho-plasmocytaires et dans leur voisinage les neurones sont à peine reconnaissables (aspect hyalin du protoplasme) et entourées d'une réaction de la neuroglie.

*Moelle.* — Lésions caractéristiques des cornes antérieures : la plupart des neurones sont en pycnose, leur protoplasme est vésiculé, les corps de Nissl ont disparu. Autour des neurones les plus altérés, une prolifération des cellules satellites réalise des images de neuronophagie typique (fig. 2). On retrouve, en somme, les lésions inflammatoires classiques de la poliomyélite.

A certains niveaux de la moelle, on constate en outre l'existence de



FIG. 2. — Poliomyélite. — Souche Lansing. — Maladie expérimentale du singe (*Ethiops sabaues*). Moelle cervicale : altération des neurones et neuronophagie. Gross.  $\times 525$  (Photo P. Jeantet.).

lésions particulières : un granulome constitué d'histiocytes et de monocytes a envahi la substance grise et déborde sur la colonne de Clark. Des plages hémorragiques (dont certaines sont en rapport avec des vaisseaux) s'observent dans le granulome qui, en certains endroits, borde des formations cavitaires discontinues.

Ce tissu granulomateux s'intrique sur tous les plans avec les lésions poliomyélitiques.

*Ganglions rachidiens.* — Quelques neurones sont altérés et présentent une raréfaction de la chromatine nucléaire. Il existe une légère réaction inflammatoire interstitielle (fig. 3).

L'examen histologique du foie, de la rate, des reins, des surrénales et des ganglions lymphatiques n'a pas montré l'existence d'altérations particulières.

**Discussion.** — La maladie expérimentale observée chez ce callitriche à la suite de l'inoculation intracérébrale de la souche Lansing de poliomyélite est comparable, par ses caractères essentiels, à la poliomyélite que l'on détermine chez le singe avec le virus classique. Notons, toutefois, l'aspect un peu inhabituel offert par l'évolution de la maladie : d'une part, coexistence de paralysies du type flasque et du type spasmodique et, d'autre part, crises convulsives passagères.

Au point de vue des lésions histologiques du névraxe, nous avons trouvé, à côté des altérations caractéristiques, des foyers d'infiltration lymphoplasmocytaire ayant l'aspect d'un véritable granulome. Ces foyers nous

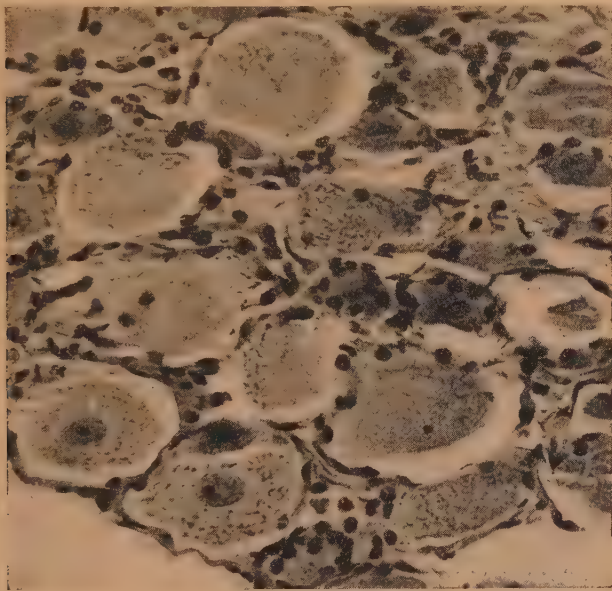


FIG. 3. — Poliomyélite. — Souche Lansing. — Maladie expérimentale du singe (*Æthiops sabæus*). Ganglion rachidien : infiltration interstitielle. Gross.  $\times 525$ . (Photo P. Jeantet.).

paraissent pouvoir être interprétés comme une réaction secondaire aux lésions poliomyélitiques.

La recherche du virus dans le névraxe et dans différents organes par inoculation à la souris a donné des résultats négatifs. Ceux-ci pourraient être la conséquence d'une infection autostérilisable selon la conception de C. Levaditi.

**Conclusions.** — Le virus poliomyélitique adapté à la souris (souche Lansing), inoculé par voie intracérébrale au callitriche *Æthiops sabæus*, a déterminé l'apparition d'une névraxite dont les caractères cliniques et anatomo-pathologiques permettent d'affirmer la nature poliomyélitique.

(Institut Pasteur.)

La communication suivante a paru en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Délipidation des anticorps et zone de floculation**, par J. POLO-NOVSKI, M. FAURE et M. MACHEBOEUR.

---

**Séance du 7 juin 1945.**

Présidence de M. MAGROU.

---

## COMMUNICATIONS

### **LA CULTURE DU STAPHYLOCOQUE ET SA TOXINOGENÈSE SUR UN MILIEU A BASE D'ACIDES AMINÉS**

par P. MERCIER et M<sup>me</sup> Y. LEHOULT.

L'étude de la nutrition azotée chez les bactéries nous a amenés à déterminer aussi exactement que possible le rôle joué par les acides aminés dans la végétation du staphylocoque. Convient-il de fournir à la bactérie des composés protéiques complexes comme l'albumine, des produits peu dégradés comme les peptones, ou très dégradés comme les acides aminés ?

Si l'on s'en tient aux données classiques, on estime que les peptones sont d'excellents aliments. Mais de plus en plus, il apparaît que les bactéries — pas plus que l'homme — ne peuvent utiliser les protéines ou les peptones telles quelles, mais qu'elles doivent d'abord les dégrader en acides aminés à partir desquels elles reconstituent leurs protéines propres. A cet effet, les bactéries sécrètent des enzymes protéolytiques qui passent dans le milieu ambiant pour y attaquer les grosses molécules de protéines ou de peptones. Certaines bactéries liquéfiant la gélatine, telles que le staphylocoque pathogène, le bacille pyocyanique, le *proteus*, etc., possèdent toute la gamme des protéinases et peuvent attaquer les protéines totales, à condition que la concentration des enzymes soit suffisante. Ce n'est pas le cas pour les milieux à base de protéines très pures. Sur de tels milieux, en effet, la digestion des protéines ne peut s'amorcer et une multiplication importante des bactéries ne peut s'installer (Bainbridge, 1911). Si au contraire, on fournit des peptones commerciales qui renferment toujours une certaine quantité d'acides aminés, la multiplication des bactéries peut

s'amorcer et grâce à ces acides aminés, la digestion des protéines se produira par l'action des protéinases libérées. On pouvait donc penser qu'en règle générale, il devait être possible d'obtenir le développement bactérien en n'offrant comme source d'azote que des acides aminés.

L'expérience a montré qu'il en était bien ainsi et depuis longtemps, on sait cultiver de nombreuses bactéries — surtout des saprophytes — à partir d'acides aminés ou même de sels ammoniacaux, comme source d'azote. Pour diverses bactéries pathogènes, il convient de fournir certains acides aminés indispensables : par exemple, lysine, tryptophane, tyrosine, etc., qu'elles ne savent pas synthétiser. D'autre part, les bactéries ont souvent besoin de facteurs de croissance, très variables d'une espèce à l'autre, par exemple, l'aneurine et l'acide nicotinique pour le staphylocoque.

En ce qui concerne plus spécialement cette bactérie, G. Ramon, A. Boivin et R. Richou ont mis au point un milieu de composition chimique définie dont la plupart des acides aminés sont fournis par un hydrolysate de gélatine (1). Sur ce milieu, la culture du staphylocoque est abondante et la production de toxine, à partir de la souche Wood, est quelquefois excellente (jusqu'à 50 unités), souvent bonne (15-20 unités) à condition d'assurer à la culture une atmosphère riche en gaz carbonique (80 p. 100 d'air et 20 p. 100 d'acide carbonique).

Pour notre part, nous avons cherché à éviter l'emploi de la gélatine, de certains acides aminés et des facteurs de croissance difficiles à obtenir dans le commerce à l'heure actuelle.

Un hydrolysate de viande de cheval — ou de toute autre viande impropre à la consommation humaine — a été essayé à la fois pour la culture du staphylocoque et pour la production de la toxine staphylococcique (2).

Le muscle a, en effet, l'avantage de contenir tous les acides aminés et les facteurs de croissance indispensables à la végétation du staphylocoque. Il n'apparaît pas utile d'ajouter du tryptophane. Par contre, nous préférons ajouter systématiquement du glucose, qui permet une végétation plus abondante (facteur de départ). Le glucose existe bien normalement dans la viande fraîche sous forme de glycogène, mais avec le temps, il risque d'être détruit (transformation en acide lactique).

Nous nous sommes arrêtés à la formule suivante :

A 1.600 g. de viande de cheval, dégraissée et hachée, on ajoute 330 c. c. d'acide sulfurique dilué au 1/3 en volume. On complète à deux litres avec de l'eau distillée et on chauffe à 130° (autoclave) durant trois heures consécutives. Après refroidissement, on filtre sur papier Laurent et on ramène le volume à 2 litres. Ensuite on neutralise presque complètement à l'aide de baryte. Il y a intérêt à demeurer en faible acidité sulfurique pour être bien sûr de ne pas avoir un excès de sels de baryum, toxiques. Après quoi, on centrifuge.

(1) G. RAMON, A. BOIVIN et R. RICHOU. *C. R. Acad. Sci.*, 1936, 203, 604.

(2) Le même milieu additionné si nécessaire d'une décoction de levure convient également pour la culture de nombreux germes : bacille typhique, colibacille, bacille de Shiga, *proteus*, pyocyanique, vibrion cholérique, bactérie charbonneuse (A. BOIVIN et M<sup>me</sup> LEHOULT) et aussi pour la culture du bacille pesteux (G. GIRARD).



Il ne reste plus qu'à amener l'hydrolysât à pH 7,4 à l'aide de lessive de soude, on stérilise alors à 115° durant quarante-cinq minutes. L'hydrolysât ainsi préparé se conserve durant plusieurs mois sans altération.

Pour la culture du staphylocoque et la production de la toxine, on répartit en ballons Fernbach de 2 litres, 250 c. c. d'hydrolysât et 750 c. c. d'eau distillée. Puis, on stérilise à 112°-115° pendant trois quarts d'heure. On ajoute alors une solution stérile de glucose à raison de 4 g. de ce sucre par litre de milieu. La stérilité du mélange sera contrôlée par un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°.

L'expérience a montré qu'à partir de la viande de cheval ainsi traitée, il était possible de préparer un milieu sur lequel le staphylocoque pouvait sécréter de la toxine. Ce milieu peut être gélosé.

Le milieu liquide ensemencé avec la souche de staphylocoques toxigènes isolée par Nélis (staphylocoque 72) est mis à l'étuve à 37° *sans faire passer le courant habituel d'air et de gaz carbonique*. Au bout de quelques heures, le milieu se trouble et au bout de vingt-quatre heures, la culture est abondante. Un voile discontinu apparaît à la surface. Après une semaine d'étuve, la culture est filtrée d'abord sur disque d'amiante, puis sur bougie Chamberland L3.

Le titre de la toxine (hémolysine  $\alpha$ ) obtenue sur l'hydrolysât atteint en général 10 unités floculantes au minimum, titre au moins égal à celui des meilleures toxines préparées à partir de la même souche avec les milieux usuels (milieu Taylor, milieu de digestion papaïnique).

De l'examen de ces premiers résultats, il ressort que l'hydrolysât de viande permet la culture du staphylocoque dans des conditions normales et la production régulière de toxine de valeur antigénique élevée. D'autre part, la culture sur milieu à base d'acides aminés assure la *toxinogénèse sans le secours d'une atmosphère enrichie en gaz carbonique* (3). Or les variations du courant gazeux influent, selon nous, d'une manière importante sur la richesse des toxines. En éliminant ce facteur de variation, il est permis d'espérer une production plus régulière de la toxine staphylococcique.

Ajoutons que les toxines obtenues sur le milieu à l'hydrolysât se transforment normalement en anatoxines par l'action combinée d'une minime proportion de formol et de la chaleur modérée (G. Ramon). D'autre part, ces anatoxines sont facilement débarrassées des matières protéiques étrangères émanant du milieu de culture, par la méthode à l'acide trichloracétique de A. Boivin.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches.)

(3) Pour les particularités de la toxinogénèse, consulter en particulier F. M. BURNET, *J. Path. a. Bact.*, 1930, 1. — G. RAMON, R. RICHOU et P. MERCIER, Rapport 1<sup>er</sup> Congrès Microbiologistes de Langue Française, Paris, 27 octobre 1938. — P. MERCIER, *Rev. Immunol.*, 1939, 5, 289.

## MÉTHODE DE TITRAGE RAPIDE DE LA PÉNICILLINE PAR INHIBITION DU POUVOIR RÉDUCTEUR DE *W. PERFRINGENS* SUR LE VERT-JANUS

par A.-R. PRÉVÔT.

Les méthodes actuellement employées pour le titrage de la pénicilline (Oxford, Heatley) sont lentes et il était intéressant de rechercher une méthode rapide pour le contrôle de l'élaboration de cette substance dans les cultures ainsi que pour la surveillance des opérations d'extraction et de purification. Quelques auteurs avaient déjà pensé à utiliser comme test la croissance rapide de *W. perfringens*, en particulier G. Heller (1) qui, indépendamment de nous mais simultanément, a mis au point une méthode très élégante fondée sur l'inhibition par la pénicilline de la production d'acroléine par cet anaérobie. Mais cette méthode n'en demande cependant pas moins de quatre à six heures d'incubation, ainsi que des manipulations délicates, telles que centrifugation séparée de chacun des tubes et sensibilisation extemporanée du réactif de l'acroléine. En utilisant le pouvoir inhibiteur de la pénicilline sur la réduction du vert-janus par *W. perfringens*, nous avons abaissé le temps de titrage à une heure environ. Cette méthode est non seulement rapide, mais d'une extrême simplicité, puisqu'elle consiste à noter la décoloration d'un indicateur de rH. Voici comment nous opérons.

**Milieu.** — Un litre de bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000, pH 7,4, est additionné de 2,5 c.c. d'une solution de vert-janus à 1 p. 100 (2) et réparti en tubes de Hall sans bille, de façon à ce que le niveau supérieur du milieu atteigne exactement l'étranglement, ce qui représente environ 7 c.c. ; on stérilise trente minutes à 110°. Le vert-janus, au cours de cette stérilisation, vire au mauve-violacé. Les tubes stockés doivent subir une ébullition de trente minutes avant l'emploi (pour provoquer l'état d'anaérobiose), puis être refroidis aux environs de 37° avant de recevoir les doses décroissantes des jus de pénicilline à titrer. Un témoin ne reçoit pas de pénicilline.

**Souche.** — Nous utilisons actuellement la souche HA, qui pousse en une heure environ, réduit le vert-janus dans le même temps et dont 0,1 c.c., ensemencé en tube de Hall, est inhibé par 0,5 unité Oxford. La souche est préalablement repiquée sur bouillon VF glucosé en tube de Hall et il faut utiliser une culture très jeune (deux heures) en pleine fermentation.

**Titration.** — On répartit très exactement d'abord les dilutions de péni-

(1) G. HELLER. Communication orale, 1945.

(2) Nous utilisons le vert-janus B marque RAL.

cilline et aussitôt après 0,1 c. c. de cette culture dans tous les tubes y compris le témoin. Cette répartition doit être extrêmement exacte, sous peine de rendre le titrage illisible et exige une petite manœuvre préparatoire : les cultures jeunes de *perfringens* dégagent énormément de gaz naissant ; il faut donc stopper pendant quelques minutes ce dégagement, qui s'il se produisait dans la pipette graduée, rendrait toute précision illusoire ; il est donc nécessaire de transvaser stérilement la souche de titrage à la pipette à boule dans un nouveau tube stérile. Ce simple transvasement provoque l'éclatement des bulles de gaz naissant et permet un pipettage exact.

Après la répartition des doses de pénicilline et de *W. perfringens*, il est absolument nécessaire de bien homogénéiser le mélange, car en général la pénicilline reste en surface et la suspension microbienne tombe au fond, ce qui provoquerait des irrégularités. Cette homogénéisation se fait au mieux en imprimant au tube tenu debout un mouvement rapide de rotation dans un plan vertical qui amène un brassage parfait du mélange. On place au bain-marie à 37°, de préférence à l'étuve, ce qui accélère le titrage. Dès que le témoin pousse (environ une heure), il se décolore. En même temps se décolorent tous les tubes où la pénicilline n'a pas inhibé la croissance du *perfringens*. Le premier tube non décoloré indique la dose minima inhibant 0,1 c. c. de *perfringens*, équivalant à 0,5 unité Oxford. Cette méthode est non seulement rapide, mais sensible, puisqu'une différence de 0,01 c. c. d'une solution pauvre de pénicilline amène la décoloration ou la non-décoloration.

Le même principe d'action inhibitrice de la pénicilline sur la décoloration des indicateurs de rH par les bactéries réductrices permet d'apprécier en un temps très court si un malade est justiciable de la pénicillothérapie. Il suffit de remplacer la suspension de *perfringens* par une suspension du matériel infectieux prélevé sur le malade (pus, sérosité) et les dilutions inconnues de pénicilline par des doses croissantes connues de pénicilline titrée. Il est bon de faire des bornes espacées : 100 u, 50 u, 25 u, 10 u, 5 u, 1 u. En quelques heures, si le matériel infectieux est pénicillo-résistant, tous les tubes sont décolorés et ceci en même temps que le témoin. Si le matériel infectieux est pénicillo-sensible, les concentrations faibles (1 u, 5 u, etc.) sont décolorées avec retard sur le témoin, mais les concentrations fortes, 10, 20, 50, 100 u, restent colorées. Ainsi le pus de pleurésie putride (3) de M. Duf... s'est montré pénicillo-sensible, de même que la sérosité de pleurésie purulente de M. Fas... Par contre, les crachats infectieux de M. Ch... étaient pénicillo-résistants et le traitement n'a pas amené d'amélioration. D'ailleurs chacun des germes pathogènes constituant les pus peut être étudié par la même méthode. C'est ainsi que nous avons pu constater entre autres la grande sensibilité de *Sph. funduliformis*, de *Staph. anaerobius*, de *V. alcalescens* et de *R. glutinosa* à la pénicilline.

(Centre de Recherches sur la Pénicilline. Institut Pasteur.)

(3) Nous remercions vivement nos collègues, les D<sup>rs</sup> R. MARTIN et SUREAU, d'avoir bien voulu nous donner ces pus et nous permettre ces recherches.

**DISSOCIATION DU *B. MÉGATHERIUM*.  
ROLE DE LA COMPOSITION DU MILIEU.  
ACTION DU BACTÉRIOPHAGE SUR LES VARIANTES**

par R. WAHL.

On sait que dans les cultures de certains bacilles sporulés aérobies, des variétés asporogènes, dites « mutilats » peuvent se développer.

En particulier, Den Dooren de Jong (1) a vu apparaître dans certaines conditions, sur les cultures anciennes de *megatherium* sur gélose des colonies secondaires de mutilat, et il a montré que beaucoup de souches de *megatherium* se montrent lysogènes pour certains de ces mutilats. Les souches normales, sporulées, seraient, au contraire, lysorésistantes.

Une étude de la dissociation dans des conditions particulières de la souche 899 de Dooren de Jong nous a montré que le phénomène est plus complexe que ne l'a dit l'auteur hollandais.

La souche 899, envoyée en 1935 par Den Dooren de Jong à M. Wollman avait été pendant six ans entretenue par repiquages massifs dans notre laboratoire. C'est une souche sporulée, du type R et lysogène.

**INFLUENCE DU MILIEU SUR LA DISSOCIATION.** — D'après Den Dooren de Jong la mutilation du *B. megatherium* est favorisée en milieu solide (gélose) par l'addition de glycérine (5 à 10 p. 100), de glucose (5 à 10 p. 100) et surtout de peptone (10 p. 100). Nous allons voir qu'une dissociation complexe apparaît dans un milieu synthétique où la source de carbone est le citrate de soude et la source d'azote le sulfate d'ammonium. Ce milieu est le suivant :

Citrate de soude trisodique. . . . .	3 g.
Sulfate d'ammonium . . . . .	2 g.
Sulfate de magnésie . . . . .	1 g.
Phosphate monopotassique . . . . .	1 g.

Ajuster à pH 7,4 avec de la lessive de soude (environ 0,5 c. c. pour 1 litre). On répartit par 10 c. c. dans des fioles d'Erlenmeyer de 30 c. c. (le *megatherium* est très aérobie).

Si on remplace le citrate de soude par le glucose, la dissociation ne se produit pas ; pas plus qu'en substituant l'asparagine au sulfate d'ammonium.

Enfin l'absence de calcium joue un rôle essentiel. Si on ajoute au même milieu synthétique 0,01 p. 100 de chlorure de calcium, les variantes lysorésistantes se produisent seules. La culture est d'ailleurs dans ce cas beaucoup moins abondante. Ceci s'explique facilement : les variantes lysosensibles au bactériophage du *megatherium* 899 sont lysées en présence de calcium au fur et à mesure de leur formation.

(1) DEN DOOREN DE JONG. *Zentralbl. Bakt.*, 1931, **120**, 1 et 15.



MODE D'APPARITION DES VARIANTES. — Les ensemencements sont faits tous les deux jours, dans le milieu synthétique dont la composition a été donnée ci-dessus. Pendant trois à quatre semaines, aucune variation apparente ne se produit et l'aspect morphologique du *B. megatherium* reste le même (bâtonnets trapus, courts et larges, formant des chaînettes de 2 à 3 éléments). Puis, à un moment donné, vers le dixième ou le quinzième repiquage, brusquement l'aspect du microbe change et il se conservera indéfiniment dans sa nouvelle forme au cours des cultures suivantes ; presque tous les éléments sont alors minces, généralement plus longs que ceux de la souche originelle, quelquefois très longs. Ils se disposent en chaînettes pouvant comprendre de très nombreux éléments. Dans les cultures anciennes, on voit, outre les spores, par endroits, de grosses boules condensées. Cet aspect rappelle ceux de notre souche de mutilat (339 de Den Dooren de Jong).

Les cultures en milieu synthétique étaient restées d'abord peu abondantes. Brusquement, en même temps que la morphologie du microbe change, la culture devient très dense.

Cependant, si on réensemence une de ces cultures en bouillon peptoné ou sur gélose inclinée, presque rien ne pousse. Sur gélose, très largement ensemencée, ne se développent que de rares colonies.

Quelques-unes sont des colonies normales, rugueuses ou lisses, d'autres sont touchées par la lyse ; plus ou moins translucides, irrégulières, découpées, en partie lysées au centre ou à la périphérie, formant des croissants, des anneaux. De certaines il ne reste que quelques débris.

A partir de ces colonies plus ou moins lysées, les ensemencements donnent les résultats les plus irréguliers et souvent restent stériles. Parfois une très mince couche microbienne commence à pousser, puis disparaît.

*Isolement et caractères des différentes variantes.* — A partir de ces cultures, on peut isoler plusieurs variantes.

Elles se caractérisent par l'existence ou non de sporulation, l'aspect des colonies et par le comportement vis-à-vis du bactériophage.

1° VARIANTES SPORULÉES. — On les isole assez facilement à partir des subcultures sur gélose, car elles sont lysorésistantes. Mais on introduit dans les repiquages du bactériophage, dont il faut déterminer l'origine. Il est donc préférable de partir d'une culture de quelques jours sur milieu synthétique, chauffée à 75° pendant une demi-heure. On détruit ainsi le bactériophage et les corps microbiens, et on part des spores. On obtient ainsi deux sortes de colonies et on isole deux variantes (2).

a) *Variante R.* — Les colonies sont grandes (2 mm. de diamètre environ). Leur surface est vallonnée, mais les bords sont réguliers (et sont légèrement découpés, comme ceux du *B. megatherium* 899 initial). Elles sont donc d'un type R moins accentué que la souche initiale. Elles sont assez fortement pigmentées en jaune. L'aspect microscopique est intermédiaire entre celui du *megatherium* originel

(2) Les qualifications R et S sont données d'après l'aspect des colonies. Il ne faut pas leur attribuer une signification plus précise.

et celui du mutilat, on y voit à la fois des formes courtes et des formes longues. Cette variante sporule assez abondamment. Elle est lysogène pour le mutilat 339 b et lysorésistante au bactériophage de la souche 899, et à son propre bactériophage. Son bactériophage paraît différent du bactériophage originel car il lyse moins complètement le mutilat 339 b (on voit des colonies demi-lysées transparentes, d'autres avec centre lysé).

b) *Variante S lysorésistante*. — Les colonies, après vingt-quatre



A gauche, variante S, asporogène et lysosensible. A droite, variante R, sporogène et lysorésistante.

heures sont plus petites (0,5 mm.), elles s'accroissent lentement, et n'ont leurs caractères nets qu'au bout de deux ou trois jours. Elles sont lisses, translucides, non pigmentées. Au bout de trois à quatre jours, elles subissent en leur centre une transformation vitreuse ; la couche microbienne devient plus mince, presque transparente, mais la gélose est rarement mise à nu. Au microscope l'aspect est celui du mutilat, mais il n'y a pas formation de boules et il y a des spores nombreuses. Cette souche est comme la précédente lysorésistante au bactériophage de la souche 899 et lysogène pour le mutilat 339 b.

c) *Variante S, lysosensible*. — Des cultures en bouillon d'un mutant asporogène lysorésistant isolé du milieu synthétique (voir plus bas) ont été conservées quatre ans à l'état sec (dessiccation à l'air libre). Après ce temps, nous y avons isolé à l'état de pureté une troisième souche sporulée. C'est une forme S par l'aspect des colonies rondes, bombées, lisses, à contours réguliers. On la met facilement en suspension homogène. Au microscope, l'aspect est le même que celui de la souche originelle. La sporulation est particulièrement abondante. Cette variante est lysogène pour le mutilat 339 b et les deux autres souches lysosensibles que nous possédons. Mais elle possède en outre un caractère très particulier, non encore décrit pour une souche de *megatherium* sporulé lysogène, elle est lysosensible (pour le bactériophage du mégathérium 899).

2° VARIANTES ASPOROGÈNES. — Leur isolement comporte certaines difficultés, car il faut les séparer non seulement des autres variantes, mais du bactériophage.

Nous avons pu isoler également deux variantes asporogènes, une forme de type intermédiaire entre R et S (lysorésistante) et une forme S (lysosensible).

a) *Variante de type intermédiaire entre R et S*. — A partir d'une subculture sur gélose ensemencée à partir d'une culture en milieu synthétique transformée, au bout de vingt-quatre heures, sur fond de culture lysé dont ne subsistent que quelques fragments irréguliers, de rares colonies se sont formées, de 3 types se différenciant par la taille différente : à partir des grandes et des moyennes, on isole des souches sporogènes. Les plus petites, en pointe d'épingles, seront l'origine de souches asporogènes lyso-résistantes. C'est surtout leur croissance très lente qui les distingue. Parfois elles n'apparaissent qu'au bout de quarante-huit heures. Elles atteignent 1 ou 2 millimètres en trois ou quatre jours. Par une série de repiquages on isole cette variante, puis par quelques passages sur gélose imprégnée de sérum antibactériophage 899 on la sépare du bactériophage.

On possède alors une souche dont les colonies ne sont pas franchement rugueuses, mais sont irrégulières. Au microscope, les cultures se montrent formées de bacilles plus minces que le mutilat, ce caractère est encore fortement marqué pour les cultures en bouillon ; les formes paraissent minces et parfois très longues. Il ne se forme pas de boule. Cette souche est résistante au bactériophage du *megatherium* 899 et non lysogène pour le mutilat 339 b. Elle n'est plus repiquable au bout d'une semaine.

b) *Variante S, lysosensible*. — On ne peut l'isoler directement, car la présence de bactériophage dans le milieu de culture empêche son développement. Il faut, pour pouvoir isoler cette variante lysosensible, des repiquages en série par colonies séparées sur des milieux où elle est soustraite à l'action du bactériophage.

Nous en avons utilisé deux : un gel de silice préparé suivant une méthode que nous avons décrite, auquel était incorporé un milieu synthétique sans calcium et un bouillon gélosé imprégné de sérum de lapin préparé par des injections de *megatherium* 899 lysogène. Dans les deux cas, le bactériophage ne peut pas se multiplier, et, au bout

de 7 à 8 repiquages, il se trouve éliminé. On peut alors reprendre la souche sur bouillon gélosé ordinaire. Les colonies lysosensibles se distinguent par leur aspect lisse de toutes les autres variétés nées dans le même milieu et plus ou moins rugueuses. Elles sont, comme celles de la variété lisse sporulée, nettement pigmentées, franchement jaunes. Microscopiquement, ce sont des formes assez grêles et longues, avec tendance à la concentration en boules du protoplasme. Une coloration au Gram peu poussée met en évidence, dans les cultures un peu âgées, des granulations intracellulaires. En somme, tous les caractères du mutilat 339 b de notre laboratoire.

Cette variante est lysée par le bactériophage du *megatherium* 899, avec formation de plages typiques, semblables à celles qu'il produit sur le mutilat 339 b.

CONCLUSIONS. — 1° Une souche de *megatherium* lysogène, même entretenue depuis longtemps au laboratoire, n'est nullement stabilisée. Elle est en perpétuelle transformation, ce qui paraît en rapport avec la présence de bactériophage, agent très actif de mutation microbienne.

2° Les dissociations décrites ici sont en relation avec la composition du milieu de culture.

3° Il nous paraît démontré que, à partir des microbes sporulés, prennent constamment naissance des formes asporogènes en grand nombre. Celles-ci sont en général sensibles au bactériophage de la souche. Il semble que la lysorésistance constatée chez certaines d'entre elles soit acquise. En tous cas, les souches sporulées se sont montrées lysogènes : mais elles ne sont pas toutes lysorésistantes, il y a des souches sporulées lysosensibles.

4° La lysosensibilité et la lysogénéité se sont montrées indépendantes des caractères des cultures (état lisse ou rugueux ; morphologie des bacilles).

5° Dans un milieu dépourvu de calcium, le bactériophage des souches lysogènes se reproduit, bien que la lyse des formes lysosensibles ne s'y fasse pas. Ceci confirme ce que nous avons déjà montré par une autre voie, avec un autre bactériophage : la multiplication du bactériophage et la lyse sont deux phénomènes indépendants l'un de l'autre.

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Chimiothérapie associée à la désensibilisation en tuberculose expérimentale. Note II. Action du p-amino-benzène-sulfonyl thiourée associé à la tuberculine, par B. KREIS.

Cultures de tissus appliquées à la solution de problèmes immunologiques. I. Etude du pouvoir nécosant des toxines microbiennes *in vitro*, par E. LASFARGUES et A. DELAUNAY.



Adsorption du virus de la maladie de Carré sur hydroxyde d'aluminium. Action, sur le complexe, de la dessiccation après congélation, par P. GORET.

---

Séance du 5 juillet 1945,

Présidence de M. GASTINEL.

---

## COMMUNICATIONS

### SUR L'ACTION DÉPRESSIVE DU VENIN DE *BITIS ARIETANS*

par PAUL BOQUET.

Depuis les travaux de Manwaring (1), de Simonds et Brandes (2), de Dragsteat et Gebauer-Fuelnegg (3), de Bartosh, Feldberg et Nagel (4), on admet que sous l'influence de l'injection d'une protéine déchaînant, les tissus de l'animal sensibilisé à cette protéine libèrent des substances capillaro-motrices comparables à l'histamine.

Déjà en 1930, Essex et Markowitz (5) avaient fait un rapprochement entre les propriétés physiologiques du venin de crotale et celles de l'histamine. Injectés dans le derme de l'homme, à petite dose, ces deux poisons produisent en effet une même réaction locale connue sous le nom de triple réponse de Lewis. D'autre part, l'injection intra-veineuse à un chien, ou à un lapin d'une faible quantité de venin d'aspic, de crotale ou de cobra, abaisse sa pression sanguine.

En se fondant sur ces observations, Chopra et Chowan (6), puis Kellaway et ses collaborateurs (7) ont émis l'hypothèse que les venins libèrent dans l'organisme, par un processus comparable à celui du choc anaphylactique, des substances histaminiques qui déclenchent des réactions vaso-motrices responsables de la chute de la pression sanguine.

Kaufmann (8) en 1896, injectant à un chien du venin de la vipère commune de France, observa un abaissement de la pression artérielle, mais ce venin renferme un facteur thrombosant capable à lui seul de

(1) *J. Immunol.*, 1925, **10**, 567 et 575.

(2) *Ibid.*, 1927, **13**, 1.

(3) *Am. J. Physiol.*, 1932, **102**, 512.

(4) *Pflügers Archiv.*, 1932, **230**, 129 et 164 ; **231**, 616.

(5) *Am. J. Physiol.*, 1930, **92**, 698 et 705.

(6) *Ind. J. Med. Res.*, 1934, **21**, 493.

(7) *Australian J. exp. Biol. a. Med. Sci.*, 1936, **14**, 57.

(8) *C. R. Soc. Biol.*, 1896, **48**, 860.

perturber la circulation. Or, parmi les Vipéridés, *Bitis arietans* sécrète un venin qui ne produit jamais de thromboses vasculaires. C'est pourquoi nous avons étudié sur le système circulatoire du lapin, ses propriétés physiopathologiques jusqu'alors inconnues.

TABLEAU I.

NUMÉRO du lapin	DOSE DE VENIN (en mg. par kg.)	PRESSIION initiale (en cm. de Hg.)	PRESSIION 10 minutes après l'injection	REMARQUE
1 . . . . .	0,2	13,6	9	Animal anesthésié à l'éther.
2 . . . . .	0,25	13	9	
3 . . . . .	0,75	14	6,2	
4 . . . . .	0,3	13,5	10,5	
TÉMOINS	DOSE d'histamine (en mg. par kg.)			
1 . . . . .	0,2	12	10	Animal anesthésié à l'éther.
2 . . . . .	0,2	14	17	



Chute de la pression carotidienne chez un lapin à la suite d'une injection de 2,58 mg. de venin de *Bitis arietans* par voie veineuse, soit 0,75 mg. par kg.

Il faut injecter dans la veine d'un lapin du poids de 2 kg., 2 milligrammes de ce venin pour le tuer en quelques heures. Une dose cinq fois moins forte n'est pas mortelle, mais aussitôt après l'injection, on enregistre une chute brusque et profonde de la pression artérielle carotidienne (tableau).

La pression se relève ensuite lentement pour atteindre son niveau initial en dix à quinze minutes.

Des doses du même venin comprises entre 0,2 et 1 milligramme par kilogramme de poids vif déterminent des troubles plus intenses et prolongés.

Deux injections d'une dose inframortelle de venin, répétées à quinze minutes d'intervalle, produisent un abaissement durable de la pression artérielle et désensibilisent l'animal à l'effet dépresseur d'une troisième épreuve pratiquée quinze minutes plus tard. Cependant, un lapin désensibilisé par ce procédé réagit à l'injection intraveineuse de 0,25 mg. de chlorhydrate d'histamine. Mais tandis que la réaction circulatoire à l'histamine est inversée chez l'animal en état de sommeil anesthésique, nous avons constamment observé de l'hypotension chez le lapin envenimé et anesthésié à l'éther ou à l'éthyluréthane.

L'administration préventive par voie veineuse d'un antihistaminique de synthèse, le 2339 RP à la dose de 5 mg. par kilogramme, quinze minutes avant l'injection de venin (0,25 mg. par kilogramme) n'a pas exercé d'effet protecteur appréciable.

Signalons enfin qu'un utérus de cobaye plongé, selon la technique de Schultze-Dale, dans une solution à 1 p. 100 de venin de *Bitis arietans*, se contracte comme l'utérus d'un sujet anaphylactique au contact de l'antigène sensibilisant.

Ces faits sont en tous points comparables aux manifestations physiopathologiques de l'envenimation telles qu'elles ont été décrites par Essex et Markowitz, puis par Kellaway à propos des venins de Colubridés et de Crotalinés. Toutefois l'irréversibilité du tracé de la pression artérielle sous l'influence des anesthésiques, ne permet pas, jusqu'à plus ample informé, d'assimiler entièrement l'action dépressive du venin de *Bitis arietans* à celle de l'histamine.

(Institut Pasteur, Garches.)

## DEGRÉ D'INHIBITION DU POUVOIR PATHOGÈNE DES TOXINES BOTULIQUES APRÈS CONTACT AVEC LA SUBSTANCE NERVEUSE (1)

par R. LEGROUX et JEAN C.-LEVADITI.

En 1898, Wassermann et Takaki [1] ont démontré que la substance nerveuse de cobaye normal, émulsionnée en présence d'une quantité appropriée de toxine tétanique est capable d'en suspendre l'effet patho-

(1) Les termes de « fixation de la toxine » ou d'« inhibition de son pouvoir pathogène » par la substance nerveuse ont été substitués par nous aux termes employés antérieurement : neutralisation ou adsorption qui ont des significations parfaitement définies en biologie ou en chimie et ne répondent pas exactement au phénomène observé.

gène. Etant donnée l'importance théorique de ce fait, que Wassermann avait interprété comme étant dû à la destruction de la toxine tétanique par la substance cérébrale normale, cette expérience a été reproduite la même année par Knorr [2], A. Marie [3], Roux et Borrel [4] et Milchner [5]. En réalité la toxine tétanique n'était pas détruite comme le croyait Wassermann, elle était seulement fixée aux particules de substance cérébrale et A. Marie [3] réussit à l'en séparer. Metchnikoff [6] constata de plus que la substance cérébrale imprégnée de toxine puis introduite dans l'organisme animal, était englobée par les phagocytes et digérée par eux en même temps que la toxine.

La toxine diphtérique dans les expériences de Morax et Marie [7], Tiffeneau et Marie [8], Guy Laroche et Grigaut [9], et celles plus récentes de Ramon, Debré et Uhry [10] se comporte de même quoique à un degré moindre. S'il s'agit de la toxine botulique l'inhibition est également faible si l'on se réfère aux résultats de Kempner et Schepilewsky [11] et à ceux plus récents de Tani [12], ce dernier ayant utilisé une toxine botulique de type A. Il faut remarquer qu'au moment où Kempner et Schepilewsky expérimentaient on ignorait encore les divers types antigéniques de *Cl. botulinum*.

L'étude de l'inhibition du pouvoir pathogène de la toxine botulique par sa mise en contact avec la substance cérébrale de cobaye ou de lapin normal a été reprise par nous dans le but de comparer le nombre de doses mortelles de toxine botulique fixées par la substance cérébrale au nombre de doses de toxine tétanique qui peuvent être fixées dans les mêmes conditions. Le pouvoir pathogène des deux toxines diffère en ce sens que la toxine botulique agit sur le système neuro-végétatif plus que sur le système nerveux central alors que la toxine tétanique a une action élective sur ce dernier.

Deux échantillons de toxine botulique, l'un de toxine botulique A, l'autre de toxine botulique B et un échantillon de toxine tétanique, utilisé à titre de témoin ont été mis en contact avec la substance cérébrale.

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL. — Nous avons établi à l'avance pour chaque échantillon des toxines que nous avons utilisées, la dose minima mortelle (d. m. m.), c'est-à-dire la dose de toxine capable de tuer le cobaye de 450 g. en quatre jours, dite unité internationale. Chaque toxine est diluée de façon à contenir 5.000 d. m. m. par centimètre cube. Une partie de cette dilution est émulsionnée avec du cerveau de cobaye normal, finement broyé au préalable, dans le rapport de 2 c. c. de dilution de toxine pour la moitié d'un cerveau de cobaye, soit 1,6 g. de matière cérébrale. L'émulsion homogène de consistance pâteuse est centrifugée dix minutes à 3.000 tours-minute, de manière à éliminer la presque totalité de la substance cérébrale ; le liquide surnageant, opalescent, est prélevé. Ce liquide ainsi que la toxine qui n'a pas subi le contact de la substance cérébrale est dilué. On injecte par voie intramusculaire à des lots de plusieurs cobayes des doses décroissantes de toxine ne contenant que 100, 10, 1 ou 1/10 de d. m. m. sous le volume constant de 1 c. c. Les cobayes inoculés peuvent mourir avec les symptômes de l'intoxication tétanique ou de l'intoxication botulique, chacun d'eux est indiqué sur le tableau par le signe (+) et la durée



moyenne de l'incubation et de la maladie est relevée pour chaque dose. D'autres cobayes survivent définitivement et chacun d'eux est indiqué par le signe (—).

L'expérimentation a porté sur un nombre d'animaux de beaucoup supérieur aux essais antérieurs dans le but d'augmenter la précision des résultats et d'éliminer, autant que faire se peut, les variations de réceptivité individuelle toujours importantes pour des doses aussi faibles.

EXPÉRIENCE I. — *Toxine tétanique*. — L'échantillon de toxine tétanique titre 150.000 unités internationales par centimètre cube. La dilution qui contient 5.000 d. m. m. par centimètre cube est émulsionnée avec la substance cérébrale de cobaye normal, puis centrifugée, enfin les dilutions successives sont inoculées aux cobayes, le résultat des injections est résumé dans le tableau I.

TABLEAU I. — *Toxine tétanique*.

NOMBRE DE D. M. M.	TÉMOIN	APRÈS CONTACT avec un cerveau de cobaye
100 . . . . .	++ 31 heures.	++++ 104 heures.
10 . . . . .	++++ 44 heures.	++ --- 216 heures.
1 . . . . .	++- 96 heures.	---

De l'examen de ce tableau, il résulte que la mise en contact de la toxine tétanique avec la substance cérébrale est capable d'inhiber l'effet pathogène d'environ 10 doses mortelles de toxine. Pour cette dilution les 5 cobayes témoins sont morts en quarante-quatre heures, tandis que les 2 autres animaux sont morts après quatre jours, donc au delà de la durée fixée par la convention internationale, et les 3 derniers ont survécu.

EXPÉRIENCE II. — *Toxine botulique A*. — L'échantillon de toxine botulique A titre 10.000 unités toxiques par centimètre cube. Il est dilué au 1/100 avant d'être mis en contact soit avec du cerveau de cobaye (1,6 g. p. 2 c.c.), soit avec du cerveau de lapin (2,6 g. p. 2 c.c.). Après centrifugation, le liquide surnageant est dilué, ainsi que la toxine qui n'a pas été mise en contact avec la substance cérébrale, jusqu'à ne contenir que 10, 1 ou 1/10 de d. m. m.

De l'examen du tableau II, il résulte que le cerveau normal de cobaye, comme le cerveau normal de lapin, inhibent tous deux l'effet d'une quantité faible mais indiscutable de toxine. Cette dose de toxine est inférieure ou égale à l'unité internationale. Les animaux résistent, ou leur mort est plus tardive que celle des animaux inoculés avec la simple dilution de toxine. Là encore comme pour la toxine tétanique, les résultats sont en accord avec tous les résultats antérieurs.

TABLEAU II. — Toxine botulique A.

NOMBRE DE D. M. M.	TÉMOIN	APRÈS CONTACT avec du cerveau de cobaye	APRÈS CONTACT avec du cerveau de lapin
10 . . . . .	+++++ 35 heures.	++ 34 heures.	++ 81 heures.
1 . . . . .	+++++ 90 heures.	++ 160 heures.	+ - 51 heures.
0,1 . . . . .	+++++++ +----- 73 heures.	++- ----- 120 heures.	+++ ++- 108 heures.

EXPÉRIENCE III. — Toxine botulique B. — L'échantillon de toxine botulique B titre 300.000 unités internationales par centimètre cube. Il est donc dilué à 1 p. 3.000 avant d'être mis en contact avec le cerveau de cobaye ou le cerveau de lapin, comme la toxine botulique A. Les résultats expérimentaux sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Toxine botulique B.

NOMBRE DE D. M. M.	TÉMOIN	APRÈS CONTACT avec du cerveau de cobaye	APRÈS CONTACT avec du cerveau de lapin
10 . . . . .	+++++ +++++ 37 heures.	+++++ +++ 38 heures.	+++++++ 57 heures.
1 . . . . .	+++++ +++++ 82 heures.	+++++ 86 heures.	+++++++ 147 heures.
0,1 . . . . .	+++++++ +++++++ 152 heures.	+++++ - 146 heures.	+++++++ +++++++ +++++ - - 172 heures.

Le nombre d'observations est suffisamment important (puisque chaque signe + ou - correspond à un cobaye inoculé) et les doses de toxine injectées suffisamment faibles pour qu'il soit évident, qu'en aucun cas ni le cerveau de cobaye, ni le cerveau de lapin n'ont inhibé l'effet pathogène de la toxine. La toxine botulique de type B ne se comporte donc pas comme les autres toxines : tétanique, diphtérique ou même botulique A.

Avant de conclure, il faut souligner que notre échantillon de toxine B a un taux d'activité pathogène de beaucoup supérieur à celui des autres toxines et que la d. m. m. (définie par la convention internationale : mort du cobaye de 350 g. en quatre jours), est difficile à

interpréter dans les expériences avec cette toxine botulique B, car les animaux injectés peuvent mourir de botulisme chronique (C. Jéramec [13]) quinze jours et même deux mois après leur inoculation, ce qui rend difficile l'appréciation d'une diminution du pouvoir toxique.

CONCLUSION. — Le degré d'inhibition du pouvoir pathogène de la toxine botulique de type A, après contact avec une quantité appropriée de substance nerveuse de cobaye normal, est très inférieur au degré d'inhibition de la toxine tétanique traitée dans les mêmes conditions. Le pouvoir pathogène de la toxine botulique de type B n'est pas modifié dans des circonstances expérimentales identiques. Il ne semble donc pas qu'on puisse établir de rapport entre l'affinité des toxines pour la substance cérébrale *in vitro* et leur tropisme, soit pour le système nerveux central pour la toxine tétanique, soit pour le système neuro-végétatif pour les toxines botuliques [14].

Une conclusion curieuse peut être en outre envisagée : Kempner et Schepilewsky expérimentaient en 1898 avec la souche de Van Ermen-gem, Tani en 1934 a utilisé une souche de type A, le résultat obtenu par nous avec la toxine de type A est identique au leur. Les résultats de nos expériences sont suffisamment différents selon qu'il s'agit de toxine A ou de la toxine B pour qu'on puisse se demander si la souche de Van Ermengem n'était pas du type A.

(Institut Pasteur.)

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] WASSERMANN (A.) et TAKAKI. *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1898, nos 1, 4 et 5.
- [2] KNORR (V.). *Munch. med. Wochenschr.*, 1898, 45, 321 et 362.
- [3] MARIE (A.). *Ces Annales*, 1898, 12, 91.
- [4] ROUX (E.) et BORREL (A.). *Ces Annales*, 1898, 12, 225.
- [5] MILCHNER. *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1898, n° 17, 369.
- [6] METCHNIKOFF (E.). *Ces Annales*, 1898, 12, 81 et 263.
- [7] MORAX (V.) et MARIE (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1902, 54, 1535.
- [8] TIEFFENEAU (M.) et MARIE (A.). *Ces Annales*, 1908, 22, 289 et 644 ; ainsi que *C. R. Soc. Biol.*, 1907, 62, 1187 et 63, 683.
- [9] LAROCHE (Guy) et GRIGAUT (A.). *Ces Annales*, 1911, 25, 892.
- [10] RAMON (G.), DEBRÉ (R.), UHRY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 112, 1188.
- [11] KEMPNER (W.) et SCHEPILEWSKY (E.). *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1898, 27, 213.
- [12] TANI (S.). *Jap. J. exp. Med.*, 1934, 12, 9 et 33.
- [13] JÉRAMEC (C.). *Rev. Immunol.*, 1936, 2, 209.
- [14] LEGROUX (R.), LEVADITI (J.) et JÉRAMEC (C.). *Ces Annales*, 1945, 71, 490.

Paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, les notes suivantes :

**Variabilité de la virulence d'une souche de bacilles tuberculeux biliés au cours de l'infection chez le cobaye,**  
par F. VAN DEINSE.

Influence antagoniste de l'asparagine et de l'acide cystéique sur la croissance du bacille tuberculeux humain, par E. PERDIGON, F. BOUQUET, M<sup>lle</sup> T. MAZAUDIER et M<sup>lle</sup> F. GODARD.

Les facteurs chimiques dans la genèse des lésions tuberculeuses chroniques, par A. DELAUNAY, R. VENDRELY et M<sup>lle</sup> J. PAGES.

Quinoléines à chaîne latérale et arylaliphatique douées de propriétés antimalariques, par A. FUNKE, D. BOVET et G. MONTEZIN.

Le botulisme expérimental du cheval et la question du botulisme naturel, par R. LEGROUX, Jean-C. LEVADITI et R. LAMY.

I. Métabolisme respiratoire du bacille de la fièvre, par A. ANDREJEW.

II. Contribution à l'étude du métabolisme respiratoire de divers types de bacilles paratuberculeux, par A. ANDREJEW.

---

### Séance du 11 octobre 1945.

Présidence de M. NÈGRE.

---

### PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. C. LEVADITI présente son ouvrage *La pénicilline et ses applications thérapeutiques* (1), qu'il a rédigé essentiellement à l'usage des médecins praticiens.

Cette monographie comporte deux parties essentielles. Dans la première, il est question du *Penicillium notatum* et de sa sécrétion antibactérienne, la pénicilline. Des problèmes d'ordre biologique y sont sommairement traités, pour autant qu'ils intéressent le médecin. La seconde partie, plus importante, embrasse l'ensemble des résultats thérapeutiques enregistrés jusqu'à ce jour dans le domaine des processus infectieux. Le mode d'emploi y est exposé comme il convient. L'auteur y ajoute des données expérimentales se rapportant aux maladies microbiennes, à la syphilis, à la fièvre récurrentielle, etc., recueillies dans notre laboratoire. L'ouvrage se termine par une étude sommaire des principes antibiotiques élaborés par des moisissures autres que le *Penicillium notatum*.

(1) Masson, édit., 150 pages, 65 figures.



## COMMUNICATIONS

## VIRULENCE DES DÉJECTIONS DE PUCES PESTEUSES

par GEORGES BLANC et MARCEL BALTAZARD.

La virulence des déjections de puces (*Xenopsylla cheopis*) a été établie par la Commission anglaise des Indes. Kato (1) a montré que cette virulence se maintenait pendant au moins huit jours. Verjbitski (2) a constaté que les déjections de puces, déposées sur du linge après dilution étaient encore virulentes après cent soixante-huit jours sur les effets conservés en milieu humide, à l'obscurité et à basse température, alors que la durée de survie du germe ne dépassait pas quatre jours sur les effets soumis à la lumière et à la dessiccation. Nous avons montré que des puces d'homme (*P. irritans*), trouvées infectées en milieu pesteux, émettaient des déjections virulentes, et que ces déjections étaient encore infectantes après cinq jours de conservation à l'air libre, à sec, à la température du laboratoire (3). Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons conservé des déjections de poux (*P. corporis*) pendant au moins neuf jours (4).

Ces expériences ont été reprises au laboratoire sur des puces d'élevage (*Xenopsylla cheopis*) en cuve, selon la technique que nous avons plusieurs fois décrite (5).

Depuis décembre 1943, un « élevage » de puces infectées de peste est entretenu à notre laboratoire (6). A l'origine, plusieurs milliers de puces neuves ont été nourries sur des cobayes pesteux, puis l'infection une fois établie chez les puces, on n'a plus mis dans la cuve que des animaux neufs, qui s'infectent en général dès le deuxième jour et meurent de peste dans la cuve. La litière de son n'étant jamais changée, des éclosions se produisent constamment ; les puces neuves s'infectent sur les animaux contaminés par leurs aînées, et ainsi de suite depuis un an et demi. Un certain nombre de récoltes de déjections ont été faites dans cette cuve, dont l'une a été utilisée pour les expériences de conservation rapportées ici. Cette récolte a été faite, selon le mode habituel, sur les poils d'un rat blanc, mis le 5 mars 1944 dans la cuve, et mort le lendemain soir. La rate et les poumons de ce rat montrent déjà, malgré la brièveté de son séjour dans la cuve, d'assez nombreux bacilles de Yersin. Les déjections récoltées sont mises dans une ampoule scellée conservée à la température du laboratoire et à l'obscurité.

Le lendemain de la récolte, 7 mars, 2 mg. de ces déjections,

(1) KATO, *Saikingaka Zassi*, 1913, 8, 218.

(2) VERJBITSKI, *J. Hyg.*, 1908, 8, 162.

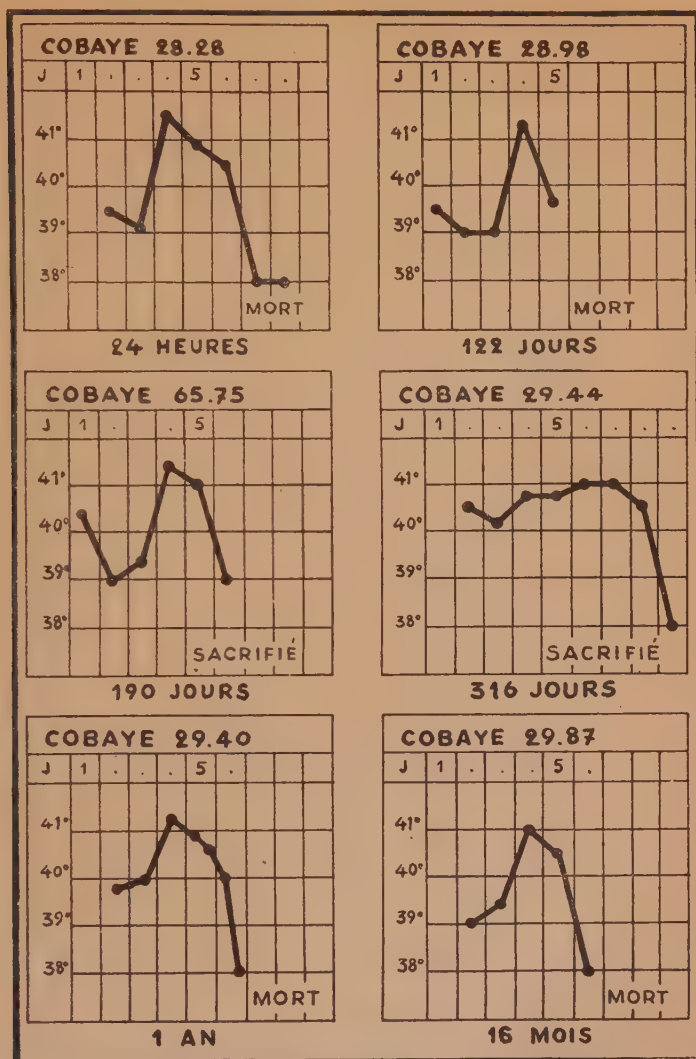
(3) G. BLANC et M. BALTAZARD, *C. R. Acad. Sci.*, 1941, 213, 813.

(4) G. BLANC et M. BALTAZARD, *C. R. Acad. Sci.*, 1941, 213, 849.

(5) G. BLANC et M. BALTAZARD, *Arch. Inst. Pasteur Maroc*, 1941, 2, 465.

(6) Spécialement pour l'obtention constante de souches de haute virulence destinées à l'inoculation des chevaux producteurs de sérum anti-pesteux.

conservées vingt-quatre heures, sont dilués et inoculés sous la peau d'un cobaye qui meurt de peste en sept jours.



Courbes de température de cobayes inoculés avec des déjections sèches de puces pesteuses, après un temps de conservation allant de vingt-quatre heures à un an et demi.

Le 7 juillet, 1 mg. après cent vingt-deux jours de conservation, est inoculé dans le péritoine d'un cobaye qui meurt de peste en cinq jours.

Le 12 septembre, après cent quatre-vingt-dix jours, même inoculation, mort en cinq jours.

Le 16 janvier, après trois cent seize jours, 1 mg. inoculé dans la cuisse d'un cobaye le tue en six jours.

Le 6 mars 1945, un an après la récolte, 2 cobayes sont inoculés, l'un avec 2 mg. par voie sous-cutanée, et l'autre avec 1 mg. par voie intrapéritonéale. Le premier meurt dix jours plus tard de peste subaiguë, avec une rate énorme farcie d'abcès, de nombreux petits abcès du foie, et les poumons envahis de nodules pesteux. Le second meurt six jours après l'inoculation : foie et poumons normaux, rate un peu grosse avec quelques petits abcès. Dans les deux cas, les examens microscopiques de frottis de rate, de foie et de poumon, ainsi que les cultures du sang et des viscères, confirment la nature pesteuse de l'infection.

Enfin, le 6 juillet 1945, un cobaye est inoculé dans la cuisse avec 1 mg. de déjections conservées depuis seize mois. Le cobaye présente, dès le quatrième jour, un ganglion inguinal gauche de la taille d'un petit pois, et meurt le 12 juillet. Pas de lésions au lieu de l'inoculation. La rate est grosse, friable, sans abcès ; le foie est granuleux et et sans abcès ; les poumons présentent d'assez nombreux infarctus, pas de nodules, ni d'abcès. Le tableau est celui d'une infection pesteuse aiguë ; les frottis du ganglion inguinal montrent la présence de quelques bacilles par champ, de même les frottis de poumons ; les frottis de rate et de foie montrent d'innombrables bacilles. Les cultures de sang du cœur, de rate et de foie, poussent abondamment. Le bacille identifié est un bacille pesteux.

Ces expériences montrent que tout ou partie des bacilles pesteux contenus dans les déjections ont gardé une virulence intacte, après seize mois de conservation à sec (7).

Quelle est la portée de ces expériences ?

Bien qu'on ne puisse affirmer que cette extrême longévité et cette conservation de virulence du bacille pesteux dans les déjections de puces gardées en tube scellé se rencontrent également dans la nature, il est bien évident que si le virus peut se maintenir dans les terriers pendant un an ou plus, sous forme de déjections de puces ou de puces mortes (8), les unes et les autres constituent immanquablement un réservoir de virus des plus importants qui, en dehors des autres modes de conservation, permettrait de comprendre le maintien enzootique de la peste en certaines régions, comme la conservation du virus dans les déjections des poux typhiques permet d'expliquer l'endémicité du typhus exanthématique.

Par ailleurs, nous avons montré que le virus se conserve également dans les déjections des puces et des poux de l'homme, et nous avons pu infecter des souris par voie muqueuse avec des déjections émises

(7) La dernière expérience faite montre que ce délai peut être porté à dix-huit mois.

(8) Des recherches actuellement en cours nous ont montré que les puces mortes contiennent encore des bacilles virulents après cent cinquante jours de conservation à sec.

par des *Pulex irritans* récoltées dans des maisons de pesteux Les déjections des ectoparasites de l'homme (9) peuvent donc infecter par voie muqueuse. Si l'on songe à la quantité considérable de poux et de puces infectés sur les pesteux, qui souillent de leurs déjections les vêtements et les objets, le rôle infectant de ces déjections paraît possible, spécialement dans la dispersion de la peste par les vêtements, dispersion dont les exemples abondent et qu'avaient si bien observée les anciens auteurs. Avec Diemberbrook, parlant du danger de laisser vendre les vêtements de pesteux et rapportant le cas d'un enfant auquel son père avait acheté et fait porter des vêtements provenant d'un autre enfant pesteux, nous pouvons dire : « Et veste et peste simul vestivit (10).

## L'ANÉMIE INFECTIEUSE DES ÉQUIDÉS (\*)

### V. — PASSAGES ACCÉLÉRÉS DU VIRUS PAR UN ORGANISME SENSIBLE

par L. A. MARTIN.

La non-fixité de la période d'incubation de l'anémie infectieuse expérimentale est un des principaux obstacles, parmi bien d'autres, auxquels se heurte l'expérimentation. Nous avons montré antérieurement que, pendant la période d'incubation apparente, silencieuse au point de vue clinique, le virus envahit la totalité de l'organisme en deux ou trois jours. Ceci nous a amené à penser que le virus « jeune » prélevé (sous forme de sérum sanguin) trois jours après l'inoculation virulente d'un sujet neuf, pourrait ne pas être identique à un virus « vieux » prélevé longtemps après le début de l'infection. On pouvait croire qu'un virus « repiqué » sur un organisme neuf doit suivre le sort de tout être vivant, qu'il passe par une phase de multiplication, de jeunesse, avant d'atteindre la forme adulte de résistance qui per-

(9) Répondant aux objections qui nous ont été faites, nous ne disons pas : il n'est d'épidémie de peste que par les ectoparasites de l'homme, mais bien : il n'est d'épidémie de peste bubonique et septicémique que lorsque s'établit la vection interhumaine par ectoparasites, quels que soient ces ectoparasites, et même s'ils ne sont pas des parasites habituels de l'homme (*Xenopsylla cheopis* « libres », *Synosternus pallidus*). Il reste cependant bien certain que les ectoparasites spécifiques de l'homme (*Pediculus*, *Pulex*), sont toujours les mieux placés par leur spécificité même et par leur nombre ; à moins de leur refuser le pouvoir pestigène, ce que controuvent nos expériences qui ne sont pas comme on l'a dit « des expériences massives qui dépassent largement les possibilités naturelles de la transmission », mais bien des expériences conduites avec des lots de puces ou de poux récoltés dans la nature, lots qui ne représentent même pas la totalité des ectoparasites d'un seul homme ou d'une seule chambre.

(10) DIEMBERBROOK, *Tractatus de peste*, Amstelaedami, 1565, 116.

(\*) Ce travail fait suite à ceux publiés dans les *Arch. Inst. Pasteur Maroc*, 1940, 2, 259.



sistera pratiquement toute la vie du porteur de virus. A cette époque de jeunesse, on pouvait supposer au virus une plus grande malléabilité. Nous espérons, en faisant des passages accélérés tous les trois jours, arriver à manipuler un virus plus dynamique, en voie de perpétuelle multiplication, qui forcerait l'organisme à répondre par une maladie apparente rapide, et que l'incubation apparente rejoindrait peu à peu l'incubation vraie.

Nous ne sommes pas arrivé au résultat escompté.

Néanmoins, nous relaterons l'expérience entreprise, qui nous montre qu'un virus « jeune » était différent d'un virus « vieux » en ce sens que, si les passages d'un virus « vieux » sont possibles indéfiniment à de longs intervalles avec des chances de succès qui sont pratiquement de 100 p. 100, il n'en est pas de même avec un virus « jeune » qui, en quelques passages (4 dans le cas présent), disparaît peu à peu du sérum. La maladie ne se transmet plus, et ce sérum privé de virus ne confère, comme cela était à prévoir, ni résistance d'ordre vaccinal, ni prémunition.

*Premier passage.* — Le 19 juillet 1944, un âne neuf 147 est infecté avec 5 c. c. de sérum prélevés le 24 juin à un donneur en plein accès. L'âne 147 réagit positivement. Incubation apparente dix jours. Mort le vingt-sixième jour.

*Deuxième passage.* — Le 22 juillet, 5 c. c. de sérum prélevés à l'âne 147 sont inoculés sous la peau de l'âne 148, qui réagit positivement après quinze jours d'incubation apparente.

*Troisième passage.* — Le 25 juillet, 5 c. c. de sérum prélevés à l'âne 148 sont inoculés sous la peau de l'âne 149, qui réagit faiblement, la courbe thermique très irrégulière ne permet pas de fixer exactement la durée de l'incubation apparente. Il survit.

*Quatrième passage.* — Le 28 juillet, 5 c. c. de sérum prélevés à l'âne 149 sont inoculés sous la peau de l'âne 150, qui réagira positivement après vingt-sept jours d'incubation. Il mourra le 25 octobre, à la fin de son troisième accès. Un passage du sang de l'âne 150 est effectué le 9 septembre à l'âne 151 qui réagit positivement.

L'âne 150 s'est donc infecté normalement.

*Cinquième passage.* — Le 31 juillet, du sérum de l'âne 150 est prélevé. Il servira le 18 août, soit après dix-huit jours de conservation à la glacière, à inoculer sous la peau les trois ânes neufs 152, 153, 154, avec chacun respectivement 5 c. c. de sérum.

L'âne 152 ne présente aucune réaction. Eprouvé trente-six jours plus tard, il réagit aussi vite (quatorze jours) et aussi nettement qu'un témoin inoculé en même temps que lui.

L'âne 153 et l'âne 154 ne réagissent ni l'un ni l'autre. Eprouvés l'un et l'autre trois mois plus tard à l'aide d'un virus certain, ils se montrent insensibles à cette épreuve.

Donc, au cinquième passage accéléré, sur 3 ânes, le virus en laisse un parfaitement réceptif à une épreuve ultérieure, et en laisse deux autres indifférents vis-à-vis d'une épreuve identique.

Ce résultat, qui n'avait aucun rapport avec l'hypothèse de travail, nous a incité à rechercher si ce virus de cinquième passage accéléré avait véritablement des propriétés spéciales.

Le 16 décembre 1944, 4 chevaux reçoivent chacun sous la peau 5 c. c.

de sérum de l'âne 150 du 31 juillet, conservé depuis cette date, sous forme de sérum liquide, à la glacière. Le délai entre la récolte du virus et son utilisation est ici de cent onze jours. Il semble bien qu'aucun de ces 4 chevaux ne se soit contaminé.

Le premier, éprouvé au bout de trente jours, a réagi fortement après treize jours d'incubation apparente.

Le deuxième, éprouvé après quarante-cinq jours, a eu son premier accès, bénin, vingt-deux jours plus tard.

Le troisième, éprouvé après quatre-vingts jours, réagit très fortement douze jours plus tard.

Le quatrième qui, comme les trois précédents, n'avait aucunement réagi au virus de quatrième passage accéléré, n'a pas été éprouvé, mais était certainement réceptif à une inoculation virulente.

Donc le virus de quatrième passage accéléré n'a ni infecté, ni protégé, contre une inoculation virulente ultérieure les 4 chevaux en expérience, alors que dans l'expérience précédente, dite de cinquième passage, 2 ânes sur trois s'étaient montrés résistants à l'épreuve.

Nous pensons que nous devons chercher l'explication de cette divergence dans le fait que le virus avait été conservé dix-huit jours la première fois, et cent onze jours la seconde. Les passages accélérés ne modifient pas la qualité du virus, mais modifient sa quantité. Peu à peu, ces repiquages hâtifs épuisent le virus, et on arrive à inoculer des doses de virus sous-infectantes. De plus, on peut penser que le virus de quatrième passage, retiré trop jeune, à trois jours, de son milieu naturel vivant, ne possède pas les qualités physiologiques de résistance qui sont si marquées pour les virus prélevés pendant la crise thermique, soit en pleine maturité. Ceci nous ramène à l'hypothèse du début : le virus de l'anémie infectieuse se comporte comme tout être vivant ; inoculé à un organisme neuf et réceptif, il se multiplie rapidement, mais ne possède pas pendant cette période de croissance intense en quantité, toutes les qualités d'un virus plus ancien, en particulier la résistance à la conservation de longue durée *in vitro*.

Au point de vue pratique, on peut supposer qu'il existe toute une gamme de virus différant entre eux par leurs qualités, ces différences étant conditionnées par la rapidité des passages et le temps de conservation hors de l'organisme. Le cas des ânes 153 et 154 semble montrer que de tels virus choisis judicieusement seraient peut-être utilisables pour la prophylaxie de la maladie.

## NOUVEAU CAS DE CHARBON SYMPTOMATIQUE CAUSÉ PAR *CLOSTRIDIUM SEPTICUM*

par A. R. PRÉVOT et M. ENESCU.

En juin 1945, dans la région de Toulouse, P. Saurat a isolé de la moelle osseuse d'une génisse qui avait présenté une tumeur de charbon symptomatique au niveau de la cuisse, un germe anaérobie pathogène

qu'il a reconnu comme n'étant pas *Cl. chauvœi*. Ce germe nous a été envoyé par cet auteur à fin de détermination et son étude complète nous a permis de l'identifier à *Cl. septicum*. Il présente en effet tous les caractères morphologiques, culturels, pathogéniques et immunologiques de cette espèce; il tue le cobaye en vingt-quatre heures après injection intramusculaire de 0,25 c. c. avec le tableau classique de l'œdème malin hémorragique extensif. Sa toxine tue la souris à la dose de 0,1 c. c. par voie veineuse; elle est entièrement neutralisée par le sérum anti-septicum de l'Institut Pasteur (1/200 c. c. de sérum neutralisant 10 d. m. m.). Son hémolysine, active au 0,001 c. c. est également neutralisée par le sérum anti-septicum à dose spécifique. La seule particularité qui le distingue un peu de l'espèce normale est qu'il produit en bouillon glucosé une petite quantité d'une substance qui après extraction à l'éther et addition de réactif d'Ehrlich (paradiméthylaminobenzaldéhyde) donne en présence d'acide chlorhydrique pur un anneau bleu caractéristique du groupe du scatol. Cette particularité biochimique n'est pas incompatible avec le diagnostic de *Cl. septicum* puisque tous les caractères majeurs de l'espèce sont présents.

Les cas de charbon symptomatique causés par des anaérobies autres que *Cl. chauvœi* sont aujourd'hui de plus en plus nombreux. Le germe le plus fréquent pouvant, en dehors de *Cl. chauvœi*, réaliser le tableau clinique du charbon symptomatique est, sans conteste, *Cl. septicum*. Viennent ensuite *Cl. œdematiens* et *W. perfringens*. Il faut donc se résoudre à considérer le charbon symptomatique non comme une maladie spécifique à étiologie unique, mais comme un syndrome anatomo-pathologique à étiologie multiple, dont le trépied est tuméfaction musculaire noirâtre + état général grave par imprégnation toxinique + évolution très rapidement mortelle.

La connaissance de ces faits n'a pas qu'un intérêt scientifique théorique, puisque la lutte contre le charbon symptomatique est uniquement d'ordre immunologique : vaccination préventive des cheptels vivant en pays contaminés et sérothérapie curative des cas déclarés. Déjà de nombreux auteurs ont préconisé la vaccination et la sérothérapie bivalente. La vaccination bivalente anti-*chauvœi* + anti-septicum a été réalisée par Manninger (1924); Allen et Rosworth (1924); Dalling (1925); Wolters (1927); Scheuber (1931); Frei et Riedmuller (1938). La vaccination polyvalente a été réalisée par Vallée (1940) contre les 4 germes rencontrés dans le charbon symptomatique : *chauvœi*, *septicum*, *œdematiens* et *perfringens*; les résultats publiés par cet auteur sont encourageants puisque sur 16.503 animaux ainsi vaccinés et vivant en milieu contaminé aucun n'a présenté de charbon symptomatique. Cette pratique est donc à faire connaître et à généraliser, car la pauvreté actuelle du cheptel français et en général européen nous commande de ne négliger aucune précaution pour le protéger contre les maladies infectieuses.

Nous remercions P. Saurat de nous avoir envoyé la souche qui nous a permis cette étude.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

## A PROPOS DES INFECTIONS INAPPARENTES A SALMONELLA

par A. NABONNE.

Alors qu'on considérait autrefois que la réaction de Widal était rarement positive avec les « agents d'entérite », nous savons qu'il n'en est très fréquemment plus ainsi (Kauffmann) [1].

Il est aujourd'hui possible de débrouiller la question des infections inapparentes à *Salmonella* grâce aux schémas antigéniques des *Salmonella* de Kauffmann-White appliqués aux séro-diagnostics qualitatifs.

A ce sujet, l'interprétation de la statistique des fièvres typhoïdes à Marseille donne à réfléchir. On retrouve en effet en moyenne dans cette région d'endémie typhique :

<i>S. typhi</i> . . . . .	dans 94 p. 100 des cas
<i>S. paratyphi</i> A . . . . .	dans 1 p. 100 — —
<i>S. paratyphi</i> B . . . . .	dans 5 p. 100 — —

Mais il ne s'agit que de cas cliniques dont la gravité et l'évolution ont nécessité l'intervention du praticien. Ce sont des cas officiellement déclarés et confirmés par le laboratoire. Il s'agit d'authentiques fièvres typhoïdes.

En dehors de ces cas il est permis de se demander si d'authentiques Salmonelloses n'auraient pas échappé à l'attention du malade lui-même en raison de la fugacité et de la bénignité des symptômes. On compte en effet dans ces régions de très nombreux cas de diarrhées fébriles passagères, avec céphalées et inappétence : fièvres muqueuses ou intestinales, selon l'expression courante, dont l'étiologie reste indéterminée et qui de plus, pour ces raisons, ne sont pas déclarées.

Dans le but d'apporter à ce sujet la technique approfondie du séro-diagnostic qualitatif, nous avons contrôlé 1.000 sérums humains d'individus adultes apparemment sains, dans la période mensuelle de juillet. Il s'agissait la plupart du temps d'individus examinés du point de vue syphilitique, mais de toute façon pour une affection étrangère aux infections intestinales. Les souches utilisées comme antigènes pour le séro-diagnostic, sont originaires des collections de l'Institut Lister de Londres, ou de l'Institut sérothérapique d'Etat de Copenhague (\*). Les antigènes ont été préparés et la réaction exécutée sur le schéma de Félix et Gardner [2] à propos des variétés de *Salmonella* suivantes :

<i>S. typhi</i> . . . . .	{ O — 901 H — 901
<i>S. paratyphi</i> A . . . . .	{ O — I, II H — a
<i>S. paratyphi</i> B . . . . .	{ O — I, IV, V H — b
<i>S. enteritidis</i> 1891 . . . . .	{ Phase non spécifique 1 et 2. O — IX H — g, m
<i>S. paratyphi</i> C . . . . .	{ O — VI, VII H — c
<i>S. typhi-murium</i> . . . . .	{ O — I, IV, V H — néant

(\*) Nous exprimons toute notre gratitude à M. le Professeur SEDALLIAN et à M. le Professeur SOHIER, de Lyon, qui nous ont confié ce précieux matériel antigénique.



Les résultats ont été observés sur 1.000 sérums contrôlés du point de vue agglutinations O et H.

ANTIGÈNES	SÉRUMS POSITIFS (p. 1.000)	POSITIF $\geq \frac{1}{80}$ (antigène O) (p. 1.000)	POSITIF $< \frac{1}{80}$ (antigène O) (p. 1.000)
<i>S. typhi</i> . . . . .	42	44	4
<i>S. paratyphi</i> A. . . . .	5	4	1
<i>S. paratyphi</i> B. . . . .	55	46	9
<i>S. paratyphi</i> C. . . . .	2	0	2
<i>Typhi-murium</i> . . . . .	0	0	0
<i>S. enteritidis</i> . . . . .	0	0	0
Total (p. 1.000) . . . . .	74	61	13

Il s'agit, nous le rappelons, de sujets apparemment indemnes d'infections intestinales.

On note que le taux des agglutinations est moyen mais cependant suffisamment important, surtout au-dessus de 1/80 pour les facteurs antigéniques O dont on sait la spécificité, même au décours d'affections fébriles intercurrentes. Les agglutinines H étaient d'ailleurs toujours présentes à des taux sensiblement équivalents. On n'observa jamais de dissociation des agglutinines O et H dans le même sérum.

Enfin, quelques sérums présentaient des agglutinines communes à deux souches différentes et dans un cas, un sérum a agglutiné à la fois : la souche de *S. typhi*, de *S. paratyphi* A et de *S. paratyphi* B. Il s'agissait vraisemblablement d'un vacciné récent.

Dans l'ensemble, les infections intriquées, relativement rares, se répartissent sur 1.000 individus de la façon suivante :

<i>S. typhi</i> + A + B. . . . .	4
<i>S. typhi</i> + A . . . . .	4
<i>S. typhi</i> + B . . . . .	8
<i>S. paratyphi</i> A + B. . . . .	1

L'identification de ces Salmonelloses humaines inapparentes, excessivement nombreuses par rapport aux cas cliniquement décelables, donne du point de vue épidémiologique un caractère nouveau aux notions anciennes. On a compté dans le même temps, en effet, pour l'ensemble de la population (584.000 habitants), 16 cas de fièvres typhoïdes apparentes à *S. typhi*.

Le contraire eût été étonnant, surtout dans ces régions méridionales où l'individu reste assez indifférent aux règles les plus élémentaires de l'hygiène. Il était difficile d'admettre, en effet, que la chaîne de contaminations favorables à l'espèce majeure, élective pour l'homme (*S. typhi*), ne soit pas favorable à la propagation de *Salmonella* effectivement plus répandues puisque certaines sont communes à l'homme et aux animaux. Il est à retenir cependant que *S. typhi murium* si fréquent en Europe du Nord, est très rare dans nos régions méridionales. Il s'agit ici, spécifiquement, de *S. paratyphi* B.

La majorité des sérums agglutine *S. paratyphi* B (55 pour 1.000), puis dans l'ordre viennent *S. typhi*, *S. paratyphi* A et *S. paratyphi* C. La disproportion des résultats propres aux infections inapparentes opposée aux typhoïdes cliniquement observées et officiellement déclarées, reste le trait dominant des résultats acquis. Du point de vue épidémiologique, ce caractère semble présenter quelque intérêt puisque *S. paratyphi* B prend rang, dans ces régions d'endémie, parmi les agents d'entérite, ce qui n'était pas évident jusqu'ici.

Cette variété de *Salmonella* ne peut donc pas, dans ces régions d'endémie typhique, jouer pratiquement un rôle important du point de vue clinique et épidémiologique en raison de son faible pouvoir pathogène. Il en est de même de *S. paratyphi* A et C dont les fréquences sont en outre insignifiantes.

La plus grande importance pratique reste à *S. typhi* dont de très nombreux cas inapparents, 12 p. 1.000, sont décelés dans la même période mensuelle que 16 cas cliniquement et biologiquement confirmés. Il s'agit, en effet, de germes hautement pathogènes pour l'homme et très répandus dans la nature, en sorte que le problème tout entier des infections inapparentes à *Salmonella*, reste pratiquement dans ces régions d'endémie, le problème particulier de *S. typhi*. Il soulève, du point de vue de la prophylaxie, un problème délicat à résoudre.

*Conclusions.* — Les infections inapparentes à *Salmonella* décelées par le séro-diagnostic qualitatif O et H, sont excessivement fréquentes à Marseille. On compte 74 p. 1.000 de sujets adultes en état d'infection inapparente pour une seule période mensuelle estivale. C'est-à-dire que pour une population globale de 400.000 adultes, le nombre de ces affections en évolution depuis plusieurs mois compte plusieurs dizaines de milliers de cas par mois (30.600).

Il va de soi que ces chiffres mensuels ne sont valables que pour le mois considéré. Durant cette période le nombre des cas en évolution dépistés, se rapporte aussi bien aux deux ou trois mois antérieurs qu'au mois écoulé durant le contrôle sérologique, en raison du délai variable de persistance des agglutinines au décours de l'infection. C'est donc à une dizaine de milliers de cas mensuels qu'on peut estimer la fréquence d'apparition mensuelle des cas de *Salmonelloses* inapparentes, sans pouvoir préciser davantage.

Cette incidence nouvelle permet d'apporter dès lors, une correction aux statistiques de morbidité basées sur 500 cas annuels officiellement déclarés en moyenne à Marseille en dehors de tout accident épidémique.

*S. paratyphi* B contribue à la majorité des cas de ces affections cliniquement muettes, mais son faible pouvoir pathogène efface son intérêt devant l'extraordinaire fréquence des formes occultes de *Salmonelloses* à *S. typhi*.

La fréquence de *Salmonelloses* à *S. typhi*, 12 pour 1.000 durant le mois écoulé, donne théoriquement pour l'ensemble de la ville 4.800 séro-diagnostics positifs. Il est donc à penser qu'au moins un millier de cas nouveaux de fièvres typhoïdes authentiques et inapparentes sont à considérer mensuellement durant cette période actuelle.

Ces résultats montrent en outre que le séro-diagnostic qualitatif peut être considéré à juste titre comme un moyen de dépistage des

porteurs de germes éventuels. Ce point particulier ne semble pas dénué d'intérêt du point de vue du problème délicat de la prophylaxie.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] KAUFFMANN (F.). — *Die Bacteriologie der Salmonella gruppe*, Einar Munkgaard, Copenhague, 1941.
- [2] FÉLIX (A.) et GARDNER (A.). — *Bull. org. Hyg. S. D. N.*, vol. VI, 1937. Genève.

## ENREGISTREMENT PHOTOMÉTRIQUE DU MODE D'ACTION DE L'ASSOCIATION DAGÉNAN-PÉNICILLINE

par BONÉT-MAURY et R. PÉRAULT.

L'enregistrement photométrique montre un mode d'action très différent pour les sulfamides et la pénicilline (1). Celle-ci manifeste une action complexe particulière, tout à la fois bactéricide, bactériostatique et bactériolytique, tandis que les sulfamides montrent une action uniquement *bactério-freinatrice*, c'est-à-dire ralentissant la multiplication microbienne.

Que se passe-t-il lorsqu'on associe ces deux puissants agents antibactériens ? La question est discutée (2).

Nous avons enregistré avec le photomètre différentiel enregistreur de Bonét-Maury et Walen, les courbes de croissance du *Staphylococcus aureus* en milieu peptoné glucosé, additionné de dagénan, de pénicilline ou des deux médicaments.

En choisissant convenablement la concentration bactérienne initiale (10 millions de germes/c. c.) ainsi que les concentrations de Dagénan (M/1.000) et de pénicilline (0,008 un. Oxf./c. c.), on observe un effet à peine marqué de l'action isolée des deux corps. Leur association aux mêmes doses se traduit par contre par un effet important, que l'enregistrement met clairement en évidence (fig. 1, 2, 3). On constate de plus que, bien que la concentration sulfamidienne soit assez élevée, la courbe de l'association n'est ni du type Dagénan, ni d'une forme nouvelle, mais est analogue à celle que l'on obtiendrait avec la pénicilline seule, à une dose supérieure à celle réellement employée. Ce résultat est particulièrement net avec la concentration bactérienne choisie, car avec des concentrations plus faibles, on distingue plus difficilement les deux types d'action (fig. 4), bien que la synergie reste cependant évidente.

Si l'on fait varier la concentration en Dagénan (fig. 3), on constate

(1) BONÉT-MAURY et PÉRAULT, ces *Annales*, 1945, 71, 495 et 1946, 72, 135, et *Nature*, 1945, 155, 701.

(2) GARROD, *Le Médecin français*, 1945, 39, 4.



que l'effet renforçateur sur la pénicilline baisse avec la concentration sulfamidienne, mais il reste encore bien marqué jusqu'à la concentration M/12.000, c'est-à-dire pour une dose très inférieure à celles qu'on peut réaliser dans l'organisme.

L'enregistrement photométrique montre donc que l'association péni-

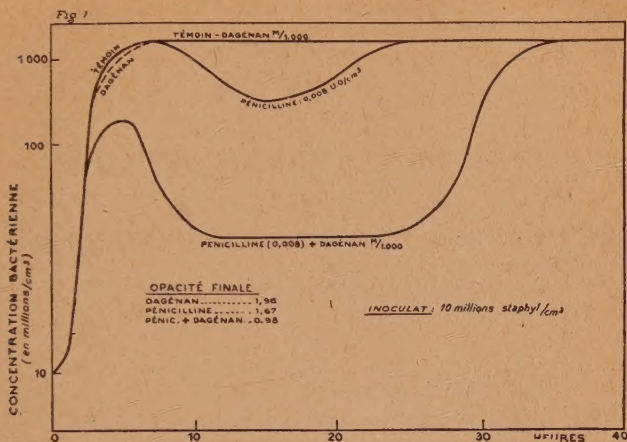


FIG. 1.

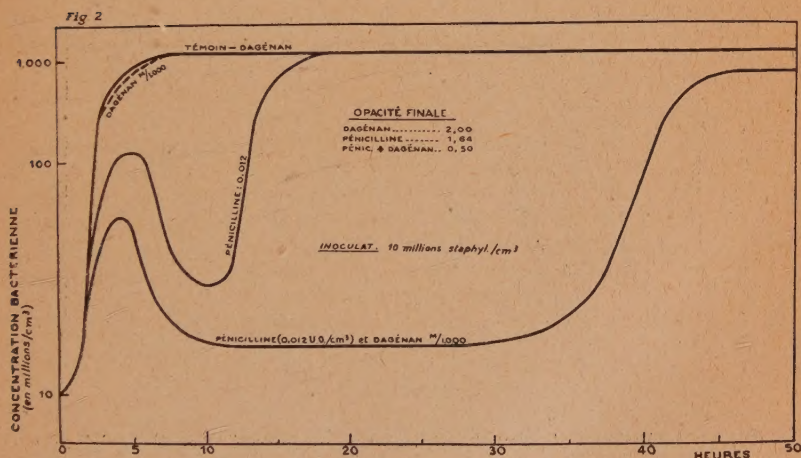


FIG. 2.

cilline-Dagénan manifeste un mode d'action du type pénicilline, c'est-à-dire que le Dagénan renforce l'action de la pénicilline. L'association agit comme de la pénicilline à une concentration supérieure à sa concentration réelle dans le mélange.

Ces résultats sont confirmés par la mesure de la concentration bactérienne à la fin de l'expérience. Le photomètre enregistreur étant peu



sensible pour les concentrations élevées, les enregistrements paraissent attribuer des valeurs pratiquement égales à des suspensions d'opacité différente. C'est pourquoi à la fin de chaque expérience nous mesurons la densité optique (en lumière blanche sous 1 cm. d'épaisseur) de chacune des fioles de l'appareil ; les déterminations sont effectuées avec

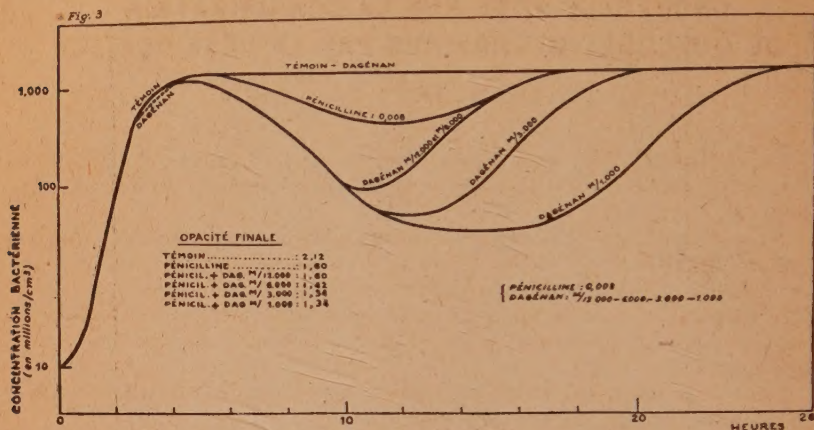


FIG. 3.

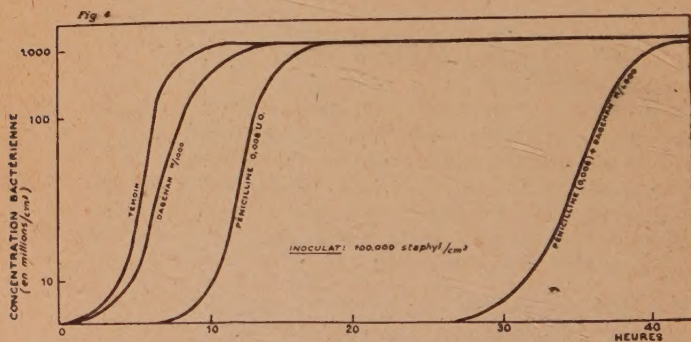


FIG. 4.

le photocolorimètre absolu de Bonét-Maury, muni du dispositif pour la mesure des troubles. Ces opacités finales sont données dans les figures 1, 2, 3 ; on constate que l'association Dagestan-pénicilline donne une concentration bactérienne finale, toujours inférieure à celle de la pénicilline.

**Conclusion.** — L'association pénicilline-Dagestan exerce sur la croissance du staphylocoque *in vitro* une action supérieure à celle de chacun des constituants. Le mode d'action du mélange est du même type que celui de la pénicilline seule ; tout se passe comme si la concentration en pénicilline était, en présence de Dagestan, supérieure à sa



concentration réelle dans le mélange. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques montrant que l'association sulfamide-pénicilline est synergique (3).

## NOUVELLE NOTE SUR LA CONSERVATION DE QUELQUES ULTRAVIRUS PAR LA DESSICCATION

par J. VERGE, P. GORET et Ch. MERTEUX.

En novembre 1941, nous avons montré que la virulence de quelques ultravirus conservés à l'état sec se maintenait pendant un temps très long (1).

Nous rappelons que la dessiccation est obtenue au moyen de l'appareil de Mudd-Flosdorf (dessiccation sous vide après congélation) et que ce procédé permet d'obtenir une déshydratation complète des tissus virulents en un temps toujours très rapide qui varie, pour un même volume, avec la richesse en tissu de la suspension et avec la nature de l'excipient.

Une suspension en sérum de cheval, par exemple, est plus rapidement desséchée qu'en eau physiologique.

Un bon procédé, recommandé par les auteurs américains, consiste à additionner la suspension aqueuse de 10 p. 100 de gomme acacia stérile.

Dans ces conditions, et pour fixer les idées, la déshydratation de 1 c. c. d'une suspension contenant 20 mg. de tissu est complète en cinq heures.

La technique permet donc, non seulement de dessécher un tissu virulent, mais encore d'obtenir, en un temps très court, la dessiccation d'une quantité définie, même minime, de ce tissu.

L'inoculation des virus desséchés, déjà utilisés en 1941, a été de nouveau pratiquée cette année avec succès.

Nous avons pensé qu'il était intéressant de publier les nouveaux temps de conservation observés.

1. VIRUS DE LA MALADIE DE CARRÉ. — Le temps de conservation de seize mois donné dans notre précédente note paraît être une durée limite. Elle est nettement inférieure à celle observée pour les autres ultravirus étudiés par nous ; aussi de nouveaux essais sont-ils actuellement en cours.

2. VIRUS DE LA FIÈVRE APTEUSE. — Des échantillons de virus O, datant de 1937 (suspension en eau physiologique ou en sérum) ont

(3) RAMMELKAMP et KOEFER, *J. Clin. Invest.*, 1943, **22**, 425. — OARD, JOHNSON et NIMAROF, *Penicillin. US office of War Information*, n° 26. — MARTIN et SUREAU, *Paris Médical*, 1944, **34**, 11, 113.

(1) Ces *Annales*, 1941, **67**, 367 (*Assoc. Microb. Langue française*, novembre 1941). Au cours de la même séance, Lépine (ces *Annales*, 1941, **67**, 370) indiquait également que la dessiccation permettait la longue conservation de nombreux ultravirus.



perdu leur virulence en 1945. En revanche, ce virus desséché après suspension en sérum normal, le 13 avril 1938 provoque encore le 14 mai 1945, l'apparition d'un aphte primaire en vingt-quatre heures et la généralisation de l'infection à la quarante-huitième heure, soit après plus de sept ans (quatre-vingt-cinq mois) de conservation.

3. VIRUS DE LA VARIOLE AVIAIRE. — Le virus desséché en avril 1939, inoculé le 7 février dernier reproduit chez le coq, après incubation de sept jours une variole aviaire typique (forme diphtérique et épithéliomateuse) soit après près de six ans (soixante-dix mois) de conservation.

4. VIRUS DE LA PESTE PORCINE. — Le virus algérien desséché en mai 1938 confère une peste porcine expérimentale typique (mort en neuf jours) à un porcelet inoculé le 22 mai 1945.

Le virus est donc demeuré actif après sept ans de conservation.

CONCLUSION. — La méthode de dessiccation après congélation suivant la technique de Mudd-Flosdorf s'affirme comme un excellent procédé de conservation des ultravirus.

Dans nos recherches arrêtées à ce jour, les délais de conservation ont été de quatre-vingt-cinq mois pour la fièvre aphteuse, soixante-dix mois pour le virus de la variole aviaire, quatre-vingt-quatre mois pour le virus de la peste porcine.

Nous nous proposons de reprendre ultérieurement les inoculations qui nous fixeront sur la limite extrême de conservation de ces virus à l'état sec.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**L'association pneumocoque-bacille de Yersin *in vivo* et *in vitro***, par G. GIRARD.

**Recherches sur deux polyosides de spécificité différente existant dans les filtrats de culture des bacilles tuberculeux**, par W. SCHAEFER.

**Sur la végétation du bacille de Koch en profondeur**, par A. ANDREJEW.

**Recherches immunochimiques sur la bactériodie charbonneuse.**  
**VI. Essais d'immunisation du cobaye par le liquide d'œdème et ses fractions**, par Pierre GRABAR et Anne-Marie STAUB.

---

Le Gérant : G. MASSON.